

**TAF4B begleitet die Differenzierung von humanen  
Makrophagen und bindet nach inflammatorischer  
Stimulation zusammen mit NFκB an den Promotor von  
*tumor necrosis factor alpha***

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Michael Schipper

aus Mainz

Marburg / Lahn 2012

Philipps



Universität  
Marburg

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 28.1.2013 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stefan Bauer

Tag der mündlichen Prüfung am: 30.1.2013

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung .....	6
2. Einleitung.....	7
2.1 Die Transkriptionsinitiation der RNA-Polymerase II.....	7
2.1.1 Die Ausbildung alternativer TAF-Komplexe .....	9
2.1.2 Die gewebespezifische Transkription durch TAF4B .....	11
2.2 Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems bilden spezifische Funktionen aus.....	13
2.2.1 Lymphozyten, Zellen des adaptiven Immunsystems .....	13
2.2.2 Die Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen und die Reaktion von Makrophagen auf pro- oder antiinflammatorische Stimuli.....	14
2.2.3 Die pro- oder antiinflammatorische Funktion von Makrophagen wird durch Stimulus-abhängige Transkriptionsmuster bestimmt.....	17
3. Fragestellung.....	21
4. Material und Methoden .....	22
4.1 Abkürzungen .....	22
4.2 Geräte und Materialien .....	22
4.3 Kits, Enzyme, Marker .....	23
4.4 Chemikalien, Lösungen und Zellkulturreagenzien .....	23
4.5 Antikörper, IgGs .....	25
4.6 Oligonukleotide .....	26
4.7 Zellkulturmethoden .....	27
4.7.1 Zellkulturmedien.....	27
4.7.2 Isolation, Kultivierung und Stimulation von primären humanen Monozyten	

4.7.3 Kultivierung und Stimulation von primären humanen Monozyten bzw. Makrophagen .....	30
4.7.4 Durchflusszytometrie.....	31
4.8 Molekularbiologische Methoden.....	32
4.8.1 RNA-Isolierung.....	32
4.8.2 Synthese von cDNA aus RNA.....	32
4.8.3 Protein-Extraktion .....	33
4.8.4 Cytoplasma-Nukleoplasma-Fraktionierung .....	33
4.8.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCRs) und statistische Auswertung .....	34
4.8.6 Proteindetektion durch Western-Blot.....	36
4.8.7 Zelluläre Proteinlokalisierung durch Immunofluoreszenz .....	38
4.8.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) .....	39
 5. Ergebnisse .....	 44
5.1 TAF4B wird mit Beginn der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen exprimiert .....	45
5.2 Die Kernlokalisierung von TAF4B mit Beginn der Differenzierung von Makrophagen deutet auf eine Funktion in der frühen Zellentwicklung hin .....	47
5.2.1 Die nukleäre Lokalisation von TAF4B während der Makrophagen-Differenzierung deutet auf eine transkriptionelle Rolle von TAF4B hin .....	47
5.2.2 Die Kolokalisation von TAF4B mit aktiver RNA-Polymerase II jedoch nicht mit Fibrillarin, deutet auf eine aktive Funktion von TAF4B in der Transkriptionsregulation während der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung hin .....	49
5.3 TAF4B ist involviert in die proinflammatorische Reaktion von reifen Makrophagen .....	52
5.3.1 Die LPS-Aktivierung von Makrophagen bedingt eine verstärkte Expression von TAF4B und induziert die Transkription der möglichen TAF4B-Zielgene <i>a20</i> und <i>tnf-<math>\alpha</math></i> .....	52
5.3.2 Die Stimulation von Makrophagen mit bakteriellen Lipopolysacchariden induziert die nukleäre Anreicherung von TAF4B, RelA und cRel .....	55

5.3.3	Die LPS-Stimulation induziert die Bindung von TAF4B an den Promotor von <i>tumor necrosis factor alpha</i> zusammen mit RelA und cRel .....	59
5.4	Die proinflammatorische Interferon $\gamma$ -Vorstimulierung von Makrophagen inhibiert die LPS-induzierte Anreicherung von TAF4B im Zellkern .....	61
5.5	Die Stimulation durch die antiinflammatorischen Cytokine Interleukin 4, 10 und 13 bedingt eine spezifische Lokalisation von TAF4B in Makrophagen.....	64
6.	<b>Diskussion</b> .....	67
6.1	Die Expression von <i>taf4B</i> , der <i>taf4B</i> -Splicevariante und <i>taf4</i> in primären Monozyten und Makrophagen .....	67
6.2	Die partielle Kolo­kalisierung von TAF4B mit TAF4 und aktiver RNA-Pol II deutet auf eine mögliche Rolle von TAF4B in der Differenzierung von Makrophagen hin .....	70
6.2.1	TAF4B scheint Polycomb-Proteine in Makrophagen nicht durch eine nukleoläre Sequestrierung zu regulieren .....	74
6.3	Regulation von TAF4B nach Aktivierung der Makrophagen mit LPS und den Cytokinen IFN $\gamma$ oder Interleukinen .....	76
6.3.1	Regulation der Bindung von TAF4B an Promotorelemente .....	79
6.3.2	Die spezifische Bindung von TAF4B an <i>tumor necrosis factor alpha</i> zusammen mit cRel und RelA .....	81
7.	<b>Ausblick</b> .....	86
8.	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	88
9.	<b>Anhang</b> .....	103

### 1. Zusammenfassung

Die TATA-Box-assoziierten Faktoren (TAFs) des TFIID-Komplexes bilden zahlreiche Funktionen aus, welche essentiell sind für die Regulation der Transkriptionsinitiation. Unter anderem interagieren verschiedene der TAFs mit Enhancer-gebundenen Aktivatoren. Dies ist notwendig für die Bildung des Transkriptionskomplexes und die Aktivierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II. Das gewebespezifische TAF4B stellt ein Paralog des ubiquitären TAF4 dar. TAF4B interagiert in verschiedenen Zelltypen spezifisch mit Transkriptionsaktivatoren, u.a. mit RelA und cRel. Der Koaktivator TAF4B ist dadurch notwendig für die Vermittlung der NF $\kappa$ B-induzierten Aktivierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II. Bisher war eine Rolle von TAF4B im Immunsystem nur für T- und B-Lymphozyten aufgezeigt. Die Zielsetzung dieser Arbeit war es, eine Funktion von TAF4B in der Reifung und Funktion von Makrophagen als Zellen des angeborenen Immunsystems aufzuzeigen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Translation von TAF4B in primären humanen Monozyten inhibiert ist. Mit einsetzender Adhärenz und Differenzierung wird das TAF4B-Protein in Makrophagen exprimiert. In dieser Phase der Makrophagen-Entwicklung kolokalisiert nukleäres TAF4B zudem partiell mit aktiver RNA Polymerase II, was auf eine Funktion von TAF4B in der Zelldifferenzierung hindeutet. In reifen Makrophagen induziert die Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden die Anreicherung von TAF4B in den Nukleus. Diese Stimulation der Makrophagen induziert zudem die spezifische Bindung von TAF4B an den Promotor von *tumor necrosis factor alpha*, zusammen mit den Transkriptions-Aktivatoren RelA und cRel. Die Stimulation der Makrophagen mit weiteren inflammatorischen Stimuli wie Interferon  $\gamma$  oder Interleukin 4, 10 und 13 bedingt darüber hinaus eine distinkte Lokalisation des TAF4B-Proteins in reifen Makrophagen, was auf eine Regulation von TAF4B durch diese Cytokine hindeutet.

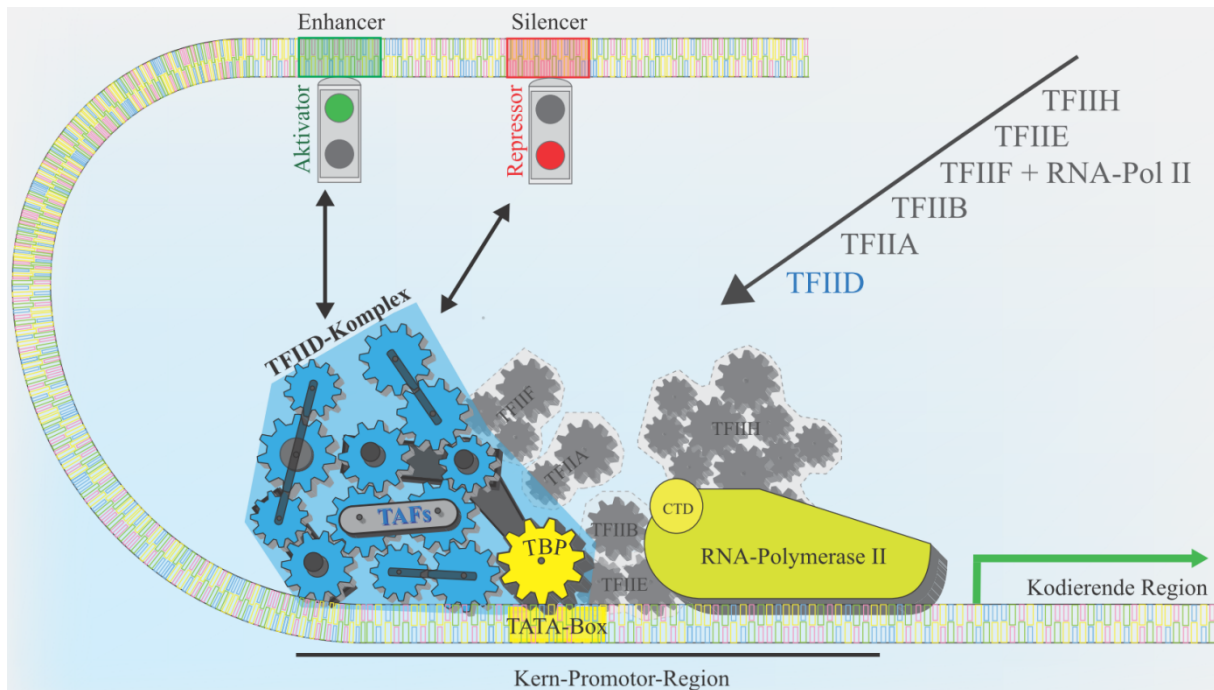
## 2. Einleitung

### 2.1 Die Transkriptionsinitiation der RNA-Polymerase II

Mit wenigen, bekannten Ausnahmen stehen jeglichen Zellen eines vielzelligen Organismus dieselben genetischen Informationen zur Verfügung. Diese Informationen werden jedoch nicht von jeder Zelle vollständig genutzt. Während der Zelldifferenzierung werden lediglich Gruppen von Genen reguliert transkribiert. Um die Homöostase eines multizellulären Organismus zu wahren, müssen Zellen in Reaktion auf extrinsische Signale die Transkription distinkter Gene aktivieren oder inhibieren. Das Ablesen der DNA mit nachfolgender Synthese der RNA wird durch die Enzyme RNA-Polymerase (RNA-Pol) I, II und III ausgeführt. Während die RNA-Pol I rRNAs und die RNA Pol III u. a. tRNAs synthetisiert, werden Gene, welche Proteine oder nicht-kodierende RNAs kodieren, durch die RNA-Polymerase II transkribiert. RNA-Polymerasen durchlaufen verschiedene Phasen des Transkriptionszyklus: die Initiation der Transkription an Promotor-Elementen des Gens, die Synthese des Transkriptes während der Elongationsphase und die Termination der Transkription. Essentiell für die Transkription sind Protein-Multimere wie RNA-Pol II, Präinitiationskomplex (PIC) sowie Chromatin-regulierende Komplexe. Als Nukleosom liegt die DNA gebunden an Histonen vor. Hierdurch ist die Regulation der Histon-Okkupanz an Promotor-Regionen essentiell für einen transkriptionell aktiven oder inaktiven Zustand der Chromatinregion (Übersichtsartikel; Berger, 2002). Die Regulation der Histone wird vor allem durch post-translationale Modifikation der N-terminalen Histonschwänze bestimmt. So führen spezifische Histon-Acetylierungen zu einem transkriptionell aktiven Zustand des Chromatins (Chen et al., 2010). Demgegenüber bedingen die Polycomb-Repressiven Komplexe (PRC) 1 und 2 durch die spezifische Methylierung von Histonschwänzen und durch die Interaktion mit Histon-deacetylierenden-Komplexen einen inaktiven Chromatin-Zustand (Pasini et al., 2004; Fiskus et al., 2006).

Die Stärke der Transkriptionsreaktion wird darüber hinaus durch die Rate bestimmt, mit welcher ein bestimmtes Transkript synthetisiert wird. Dies hängt von der Bildung des PIC an der Promotor-Region und dem Eintreten der RNA-Pol II in eine stabile Elongation und Synthese des Transkripts ab (Übersichtsartikel; Dvir, 2002). Der heteromere PIC besteht aus den basalen Transkriptionsfaktoren II (TFII)-A, B, D, E, F und H sowie der RNA-Pol II

(Abbildung 1). Der PIC erkennt spezifische Abschnitte des Promotorbereichs. So wird gewährleistet, dass die Transkription an einem definierten Startpunkt des Promotors beginnt.



**Abbildung 1. Schematische Darstellung des Präinitiationskomplexes.** Aufgezeigt ist die Reihenfolge der Bildung des PIC, beginnend mit der Promotor-Bindung durch TFIID und der damit verbundenen Biegung der Gen-Region durch Untereinheiten des PIC. Der TFIID-Komplex interagiert durch verschiedene TAFs (TAF 1-14) mit Aktivatoren oder Repressoren welche Enhancer oder Silencer-Elemente des Gen-Locus binden und so zu einer Verstärkung oder Inhibition der Transkription der kodierenden Gen-Region führen.

Die TFIIA-H bilden den PIC am Promotor in geordneter Abfolge, mit TFIID zu Beginn und TFIIH zum Ende der Komplex-Bildung. Initial und notwendig für die Bildung des PIC ist die Kern-Promotor-Erkennung und-Bindung durch den heteromeren TFIID-Komplex. Hierdurch bildet der TFIID vermutlich die Plattform für die nachfolgenden Untereinheiten des PIC und reguliert zudem auch die Synthese-Rate der RNA Pol II (Colgan and Manley, 1992; Übersichtsartikel; Thomas and Chiang, 2006).

Der TFIID-Komplex wird gebildet durch das TBP (TATA-Box-bindendes Protein) sowie durch 13 - 14 TAFs (TBP-assoziierten Faktoren), mit einer molekularen Masse zwischen 18 und 250 kDa. Einige TAFs stellen Gerüstproteine dar, während andere enzymatische Eigenschaften besitzen oder basale Promotor-Elemente binden. Weitere spezifische Domänen können zudem notwendig sein für die Aktivität des PIC. Durch Bromo-Domänen bindet TAF1 z.B. an acetylierte Histonschwänze, welche mit einem transkriptionell aktiven



Chromatin-Status assoziiert sind (Tora, 2002; Thomas and Chiang, 2006). Die Bildung und Aktivität des TFIID-Komplexes wird zum Teil gesteuert durch die Lokalisation von TAFs im Cytoplasma oder Nukleoplasma (Segil et al., 1996; Guven-Ozkan et al., 2008). Zudem spielt die Phosphorylierung von TBP und TAFs eine Rolle für den Zusammenbau und die Transkriptionsaktivität des TFIID-Komplexes (Segil et al., 1996; Biggs et al., 1998; Pijnappel et al., 2009).

Die Regulation der Transkription wird jedoch nicht alleinig durch die Komposition der Kern-Promotor-Sequenz bestimmt, sondern zudem durch meist cis-regulatorische DNA-Sequenzen wie Enhancer- oder Silencer-Elemente. Diese DNA-Elemente werden durch Aktivatoren oder Repressoren gebunden und wirken aktivierend bzw. reprimierend auf die Transkription des jeweiligen Gens (Arnosti and Kulkarni, 2005). Enhancer-Elemente können 100 kB um einen Promotor lokalisiert sein und liegen meist gehäuft in einer Gen-Region vor, was die Interaktion verschiedener Aktivatoren zulässt. Diese kooperative Interaktion von Aktivatoren scheint notwendig für die Aktivierung der Transkription zu sein (Arnosti and Kulkarni, 2005; Panne, 2008; Goh et al., 2010). Die Transkriptionsaktivierung durch Aktivatoren ist jedoch abhängig von den Promotor-gebundenen TAFs des TFIID (Verrijzer and Tjian, 1996). Durch distinkte Binde-Domänen interagieren TAFs spezifisch mit Aktivatoren und ermöglichen als Koaktivatoren zelluläre Signale der Enhancer-gebunden Faktoren zum PIC zu vermitteln (Thomas and Chiang, 2006). Zahlreiche Aktivatoren binden erst nach einem bestimmten Stimulus der Zelle an Enhancer-Elemente (Goh et al., 2010). Die Zelle ist damit in der Lage, Signale durch die Enhancer-Bindung der Aktivatoren über den TFIID in die Transkriptions-Initiation notwendiger Gene zu integrieren. Die jeder Zelle zu Verfügung stehende Information des Kern-Promotorbereichs wird so aufgrund der geregelten Bindung von TAFs und Aktivatoren auf eine zellspezifische Genexpression angepasst.

### **2.1.1 Die Ausbildung alternativer TAF-Komplexe**

Das TBP bindet sowohl TATA-Box-enhaltende als auch TATA-lose Promotorabschnitte, letztere allerdings mit herabgesetzter Affinität (Tora and Timmers, 2010). Das TBP ist damit in der Lage, eine basale Transkription zu induzieren, wenn eine TATA-Box im gebundenen Promotor vorliegt; jedoch besitzen 76 % der humanen Promotoren kein TATA-Box-Element (Yang et al., 2007). Im Fall eines TATA-Box-losen Promotors werden TAFs für die

Ausführung der basalen sowie aktivierten Transkription benötigt, vermutlich aufgrund der zusätzlichen DNA-Bindeaktivität einiger TAFs an weitere Kernpromotor-Elemente (Pugh and Tjian, 1991; Übersichtsartikel: Verrijzer and Tjian, 1996). TAF6 und TAF9 sowie TAF4 und TAF12 bilden einen Komplex aus, welcher dem Oktamer-Komplex der Histon-Untereinheiten ähnelt. Diese Interaktion von TAFs verstärkt vermutlich die intrinsische DNA-Bindeaffinität einiger TAFs an Promotoren (Shao et al., 2005). Neben der direkten Bindung an DNA-Elemente des Kernpromotors regulieren verschiedene TAFs die Funktion des TFIID durch die Interaktion mit Enhancer-gebundenen Aktivatoren, speziell mit deren Aktivierungs-Domänen (Übersichtsartikel: Verrijzer and Tjian, 1996; Thomas and Chiang, 2006). So stellen TAF4 und andere TAFs durch diese Interaktion Koaktivatoren in der Transkriptionsregulation dar (Lavigne et al., 1996; Yamit-hezi and Dikstein, 1998). Aus diesem Grund müssen bestimmte TAFs im TFIID-Komplex vorliegen, damit Aktivator-Signale an den PIC vermittelt werden können.

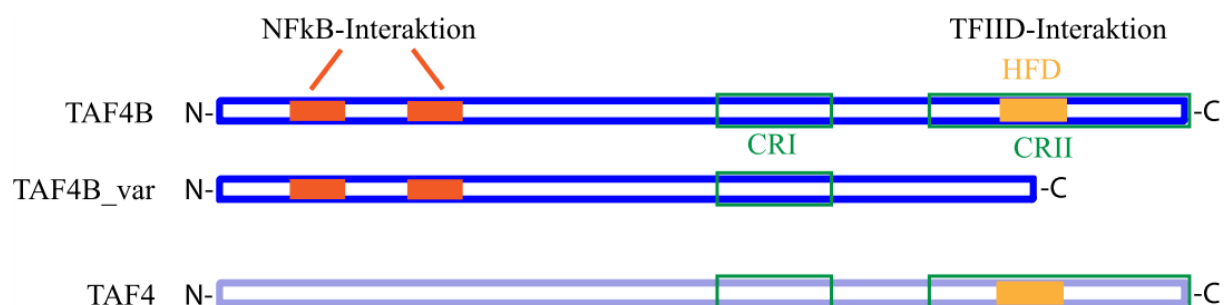
Vermutlich durch Gen-Duplikation entstanden, exprimieren verschiedene Organismen wie *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* und Säugetiere Paraloge der TAF-Proteine. So werden neben ubiquitären TAFs die Paraloge TAF4B, TAF7L oder TAF9B Gewebespezifisch in Säugetieren exprimiert (Paraloge von TAF4, TAF7 und TAF9; Chen and Manley, 2003; Übersichtsartikel: Freiman, 2009; Li et al., 2009). Die TAF-Varianten integrieren ebenfalls in den TFIID-Komplex, interagieren zum Teil aber spezifisch mit anderen Aktivatoren und Transkriptionsfaktoren im Vergleich zu ihren ubiquitär exprimierten Homologen (Yamit-hezi and Dikstein, 1998; Yamit-hezi et al., 2000). So werden während der prämeiotischen G2 Phase der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* fünf testisspezifische Paraloge der ubiquitären TAFs (tTAFs) exprimiert. In der meiotischen Prophase der Spermatogenese von *Drosophila melanogaster* kolokalisieren die tTAFs, wie das TAF4-Homolog No Hitter, zusammen mit Polycomb-Proteinen im Nukleolus und sind zudem notwendig für die nukleoläre Sequestrierung von Pc, Ph (Polyhomeotic) und Ring1 (Chen et al., 2005). Die Kooperation der testisspezifischen TAF-Paraloge in *D. melanogaster* mit Polycomb-Proteinen ist notwendig für die Aktivierung spezifischer Transkriptionsmuster (Chen et al., 2005). Des Weiteren wurde in den Spermatozyten die Kooperation der testisspezifischen TAFs mit dem *Drosophila* tBRD-1 (testisspezifischen Bromodomänenprotein-1) detektiert, welche für distinkte Prozesse in der postmeiotischen Entwicklung notwendig ist. (Leser et al., 2012). Damit erweitern TAF-Paraloge durch die

spezifische Interaktion mit Transkriptions-regulierenden Faktoren das Spektrum des TFIID zur Regulation und zur Aktivierung distinkter Transkriptionsmuster.

### 2.1.2 Die gewebespezifische Transkription durch TAF4B

TAF4B/TAFII105 ist ein Paralog des ubiquitär exprimierten TAF4. Zahlreiche Arbeiten zeigen die Funktion von TAF4B in der Differenzierung und Funktion in Zellen des adaptiven Immunsystems auf (Rashevsky-Finkel et al., 2001; Matza et al., 2002; Silkov et al., 2002). Des Weiteren reguliert TAF4B auch in Granulosa-Zellen und einigen weiteren Zelltypen die Transkription (Dikstein et al., 1996; Freiman et al., 2001; Kalogeropoulou et al., 2010). Das *taf4B*-Gen wird in verschiedensten Zelltypen transkribiert, jedoch wird das TAF4B-Protein gewebespezifisch translatiert (Wu et al., 2005). Dies führt auch dazu, dass TAF4B in differenzierenden Lymphozyten ab einem bestimmten Entwicklungs-Stadium exprimiert wird (Silkov et al., 2002). Zudem wurde in Lymphozyten und HEK-Zellen gezeigt, dass TAF4B nach einem Stimulus in den Nukleus transloziert, um in den Transkriptionskomplex zu integrieren (Yamit-hezi and Dikstein, 1998; Übersichtsartikel: Albright and Tjian, 2000; Rashevsky-Finkel et al., 2001).

Die Paraloge TAF4B und TAF4 besitzen im C-terminalen Bereich konservierte Regionen (CRI und CRII), dennoch weisen die Proteine auch in diesem Bereich unterschiedliche Proteinsequenzen auf (**Abbildung 2**). Die Funktion der CRI-Region ist unbekannt. Verschiedene Versuchsansätze zeigen, dass die CRII-Region Domänen des C-Terminus von



**Abbildung 2. Schematische Darstellung der bekannten Protein-Domänen von TAF4B, der TAF4B-Splicevariante (TAF4B\_var) und TAF4.** Dargestellt sind die N-terminal gelegenen NFκB-Interaktionsdomänen in rot sowie die C-terminal konservierten Regionen (CRI und CRII; conserved region). Die CRII beinhaltet u.a. die Histon-Falte-Domäne (HFD). Der Proteinsequenz-Vergleich zwischen TAF4B der TAF4B-Splicevariante und TAF4B und TAF4 ist im Anhang dargestellt, siehe **Abbildung 21** (Seite 103) und **Abbildung 22** (Seite 104).

TAF4B und TAF4 umfasst, welche wahrscheinlich notwendig sind für die Interaktion mit TAF12, die Integration in den TFIID und die DNA-Bindung (Übersichtsartikel: Davidson et al., 2005; Shao et al., 2005). Die Promotor-Bindung wird durch die hier lokalisierte Histon-Falte-Domäne (HFD) vermittelt. Zudem verstärkt die Bildung eines TAF4:TAF12-Proteinkomplexes durch die HFDs von TAF4B und TAF12 die Promotor-Bindung des gebildeten Dimers. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)-Studien zeigen, dass der Histon-ähnliche TAF-Proteinkomplex dabei DNA-Abschnitte von definierter Länge (70 Bp) präferiert (Shao et al., 2005; Gazit et al., 2009). Übereinstimmend damit zeigt der Vergleich der Protein-Struktur eines TAF4B- und TAF4 enthaltenden TFIID, dass die Integration von TAF4B die Struktur des TFIID verändert. Aus diesem Grund ist nicht vollständig klar, ob die Promotor-Spezifität von TAF4B *in vivo* durch die intrinsische DNA-Bindeaffinität des TAF4B-Proteins oder eine alternative Struktur des TAF4B-enthaltenden TFIID-Komplexes bedingt wird (Liu et al., 2008). Möglicherweise wird zudem in manchen Zelltypen eine TAF4B-Splicevariante exprimiert (Wu et al., 2005). Diese mögliche TAF4B Splicevariante wäre C-terminal verkürzt (**Abbildung 2**). Dementsprechend würde der Variante die TFIID-Interaktionsdomäne fehlen. Aus diesem Grund wird davon ausgegangen, dass das verkürzte TAF4B-Protein zwar an die Zielpromotoren binden könnte, jedoch nicht in den Transkriptionskomplex integrieren würde und deswegen die Transkriptions-Initiation des Zielgens blockieren könnte (Wu et al., 2005).

Während der C-Terminus von TAF4B und TAF4 in hohem Maß konserviert ist, zeigt der N-Terminus der TAF4/4B-Proteine eine starke Divergenz. In diesem Bereich liegen Domänen, durch welche TAF4B und TAF4 mit Aktivatoren interagieren. Aufgrund der N-terminalen Divergenz interagiert TAF4B im Gegensatz zu TAF4 z. B. mit den Aktivatoren RelA/p65 und cRel der NFκB-Protein-Familie (Yamit-hezi and Dikstein, 1998). So konnte in Zellkulturversuchen aufgezeigt werden, dass TAF4B Stimulus-induziert mit Aktivatoren wie RelA interagiert (Yamit-hezi and Dikstein, 1998) und so zelluläre Signale in die Transkriptionsinitiation spezifischer Gene integriert (Wolstein et al., 2000; Übersichtsartikel: Albright and Tjian, 2000). Damit übereinstimmend bindet TAF4B in Zelllinien mit B- bzw. T-Zellcharakter an den Promotor von *a20* und reguliert die Transkription des Gens durch die Interaktion mit RelA (Ainbinder et al., 2002; Silkov et al., 2002).

Verschiedene Arbeiten zeigen, dass TAF4B teilweise mit TAF4 um die Bindung an Promotoren konkurrieren könnte (Mengus et al., 2005). Dabei handelt es sich vermutlich um

eine nicht-redundante Bindung von TAF4B oder TAF4, da beide TAFs mit unterschiedlichen Transkriptionsaktivatoren interagieren. So wird relativ zu TAF4 die Transkription von TAF4B-Zielgenen stark erhöht aufgrund der spezifischen Aktivator-Interaktion mit promotorgebundenen TAF4B (Liu et al., 2008).

Zusammengefasst konnte bis jetzt in Lymphozyten und einigen weiteren Zelltypen gezeigt werden, dass TAF4B durch eine spezifische Promotorbindung und Aktivator-Interaktion für eine distinkte Gen-Expression notwendig ist. Die regulierte Expression von TAF4B und Integration in den TFIID erhöht die transkriptionelle Flexibilität des Transkriptionskomplexes auch in der Reaktion auf zelluläre Stimuli. Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass die Funktion von TAF4B während der Transkription durch die Promotorbindeaffinität eines TAF4B-enthaltenden TFIID reguliert wird, durch die spezifische Interaktion von TAF4B mit Transkriptionsaktivatoren, sowie durch das Verhältnis der nukleären Menge von TAF4B im Vergleich zu TAF4.

## **2.2 Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems bilden spezifische Funktionen aus**

### **2.2.1 Lymphozyten, Zellen des adaptiven Immunsystems**

Die Zellen des Immunsystems werden grundsätzlich in zwei Zweige unterteilt, in Leukozyten des adaptiven sowie des angeborenen Immunsystems. Ebenso wie rote Blutkörperchen entwickeln sich alle Leukozyten aus hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, dringen vom Knochenmark in den Blutstrom ein und gelangen hierüber zu den jeweiligen Bestimmungsorten. Das adaptive Immunsystem setzt sich aus B- und T-Lymphozyten zusammen, welche in der Lage sind, spezifisch auf inflammatorische Stimuli zu reagieren. (Janeway et al., 2001)..

In den Vorläuferzellen der B-Lymphozyten findet während der Differenzierung im Knochenmark durch die somatische Rekombination die Bildung spezifischer Immunglobuline statt, welche membranständig als B-Zell-Rezeptor (BCR) bezeichnet werden (Lehrbuch: Janeway et al., 2001; Schütt and Bröker, 2009). B-Zellen wandern nun in periphere Lymphorgane aus und differenzieren hier zu reifen B-Lymphozyten. Werden die

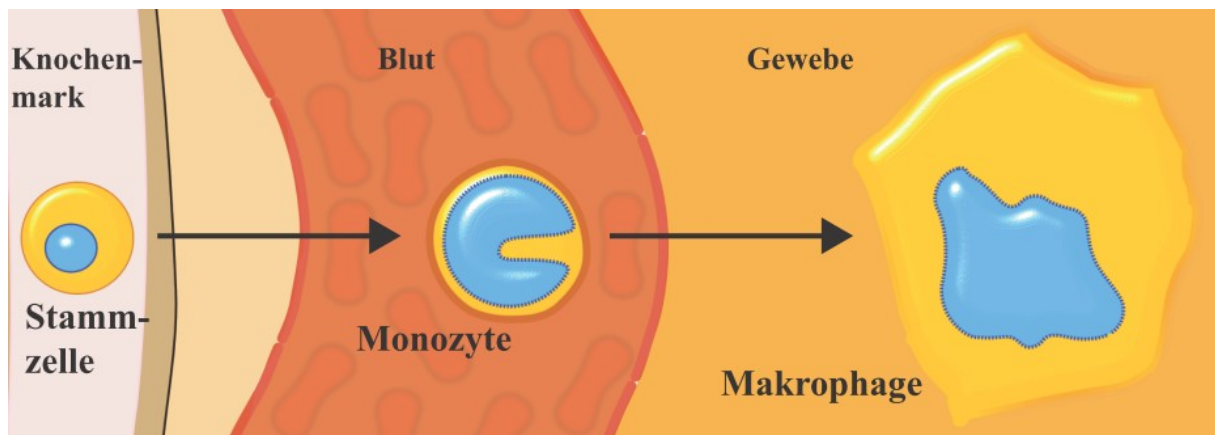
antigenspezifischen B-Lymphozyten durch einen Antigen-BCR-Kontakt aktiviert, entwickeln sie sich zu Plasma-Zellen, welche proliferieren und die antigenspezifischen Antikörper ausschütten, oder zu langlebigen B-Gedächtnis-Zellen (Übersichtsartikel: LeBien and Tedder, 2008).

Vorläufer von T-Lymphozyten wandern in das Thymus-Gewebe. Der größte Teil der differenzierenden Thymocyten tritt hier aufgrund von Selektionsmechanismen in die Apoptose ein, nur ein geringer Teil der Zellen differenziert zu maturen T-Zellen. T-Lymphozyten bilden ebenfalls durch die somatische Rekombination antigen-spezifische T-Zell-Rezeptoren (TCRs) aus. Die TCRs bleiben im Gegensatz zu Immunglobulinen der B-Lymphozyten membranständig. T-Lymphozyten differenzieren im Thymus zu T-Effektorzellen, d.h. zu cytotoxischen T-Zellen, T-Helferzellen und zahlreichen Subtypen wie z.B. regulatorischen T-Zellen (T-Helferzell-Subtyp). Die reifen T-Lymphozyten verlassen schließlich den Thymus und treten in den Blutkreislauf ein. Ein spezifischer Kontakt zwischen Antigen und TCR bedingt die Proliferation und Aktivierung der T-Zellen was als „Priming“ bezeichnet wird. Das Priming induziert die Bindung und Zerstörung von Zielzellen durch cytotoxische T-Zellen. Aktivierte cytotoxische T-Zellen sezernieren darüber hinaus Cytokine wie Interferon  $\gamma$ , welche u.a. Makrophagen stimulieren. T-Helferzellen ( $T_H$ ) differenzieren nach dem Priming in  $T_{H1}$  und  $T_{H2}$ .  $T_{H1}$  sind ebenfalls in der Lage durch Interferon  $\gamma$  und Zell-Zell-Kontakte Makrophagen zu aktivieren.  $T_{H2}$  sezernieren verschiedene Cytokine wie Interleukin (IL)-4 und IL-13 und modulieren so die Immunreaktion weiterer Immunzelltypen wie Makrophagen (Übersichtsartikel: Larosa and Orange, 2008). Regulatorische T-Zellen exprimieren ebenfalls Faktoren wie IL-10, durch welche sie eine immunsuppressive Funktion besitzen und das Ausmaß der Immunreaktion regulieren (Übersichtsartikel: Larosa and Orange, 2008; Lehrbuch: Schütt and Bröker, 2009).

### **2.2.2 Die Entwicklung von Monozyten zu Makrophagen und die Reaktion von Makrophagen auf pro- oder antiinflammatorische Stimuli**

Monozyten stellen Immunzellen des angeborenen Immunsystems dar. Nach der Entwicklung aus den hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks treten auch sie in den Blutkreislauf ein (**Abbildung 3**). Monozyten weisen charakteristische Merkmale auf, wie einen nierenförmigen Nukleus, ein geringes Nukleoplasma/Cytoplasma-Verhältnis und die

Expression spezifischer Oberflächenmoleküle wie den LPS-Korezeptor CD14. Die im Blut vorliegende Monozyten- Population ist heterogen, so bildet ein geringer Anteil der Monozyten (etwa 10-20 %) andere Oberflächenrezeptoren und Reaktionen auf Stimuli aus. Die funktionellen Unterschiede der Monozyten-Subpopulationen sind jedoch noch unbekannt (Übersichtsartikel: Auffray et al., 2009). Monozyten sind in der Lage, an das Blutgefäßepithel



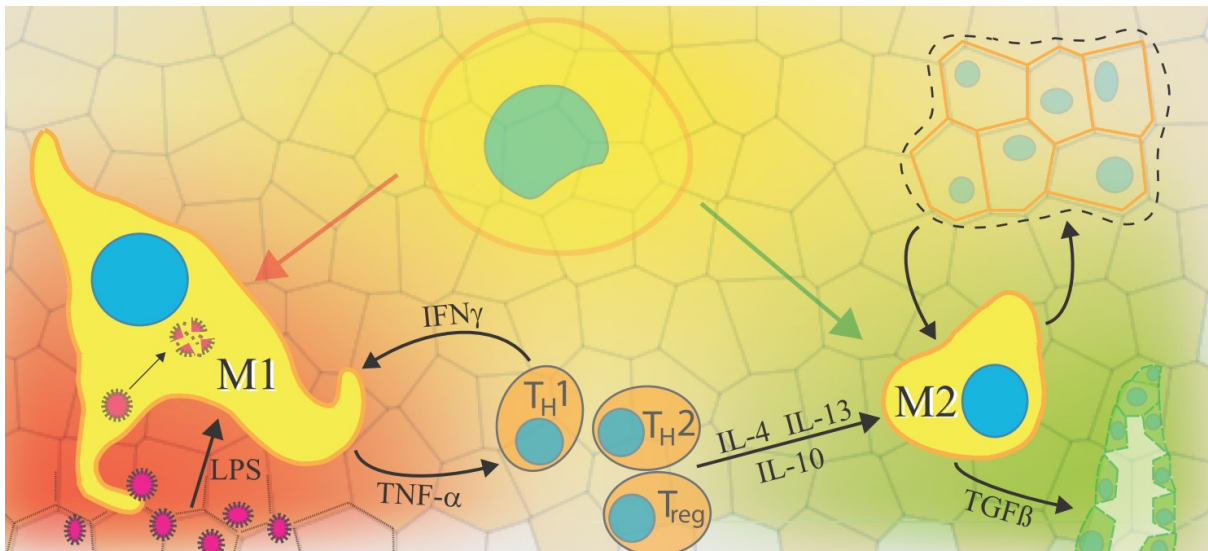
**Abbildung 3. Schematische Darstellung der Entwicklung von reifen Makrophagen.** Hämatopoetische Stammzellen wandern aus dem Knochenmark aus und differenzieren zu Monozyten, welche im Blut vorliegen. Diese Monozyten adhären an das Blutgefäß-Epithel, wandern in Gewebe ein und differenzieren hier weiter zu Makrophagen.

zu binden und in das Gewebe einzuwandern. Mit der Adhärenz der fluiden Monozyten an das Epithel der Blutgefäße beginnt die Differenzierung der Zellen zu Makrophagen. Nach einer einfachen Definition sind Monozyten mit Beginn der Adhärenz Makrophagen. Dabei stellt die Adhärenz allein einen Stimulus dar, welcher die Hochregulation der Transkription von verschiedenen Genen bedingt (Liu et al., 2008). Die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist morphologisch u.a. gekennzeichnet durch eine Zunahme des Cytoplasmas im Verhältnis zum Nukleoplasma. Zudem induziert die einsetzende Differenzierung die Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren. Damit einher geht eine Änderung der Transkription und Genexpression mit voranschreitender Entwicklung zu reifen Makrophagen (Valledor et al., 1998, 2006). Die Reifung der Monozyten zu Makrophagen führt dazu, dass Makrophagen verstärkt in der Lage sind Pathogene zu erkennen und abzuwehren (Newman et al., 1980; Gessani et al., 1993; MacKenzie et al., 2002). *In vitro* gelten Makrophagen schließlich als vollständig entwickelt, welche für etwa sieben Tage in Kultur gehalten wurden (Valledor et al., 2006).

Makrophagen stellen Effektor-Zellen des angeborenen Immunsystems dar und reagieren in dieser Funktion auf eindringende Pathogene. Zudem sind Makrophagen u.a. in die Reparatur von verletztem Gewebe oder in die Gewebe-Homöostase involviert. Makrophagen liegen in verschiedensten Geweben wie Leber (Kupffer-Zellen), Hirn und Rückenmark (Microglia-Zellen), Thymus, Testis und Epidermis (Langerhans-Zellen) vor. Hier sind Makrophagen notwendig für inflammatorische Reaktionen sowie für eine Erhaltung der Gewebe-Homöostase (Übersichtsartikel: Naito et al., 1997; Übersichtsartikel: Cohen et al., 1999; Chorro et al., 2009). Im Thymus vorliegende Makrophagen phagozytieren z.B. die zahlreich in die Apoptose eintretenden Thymocyten und sind so an der Regulation der Thymus-Homöostase beteiligt (Surh and Sprent, 1994). Die unterschiedlichen Charakteristika dieser Makrophagen-Subpopulationen sind auch durch die Signale des umgebenden Gewebes bedingt, z.B. durch verschiedene Cytokine wie dem Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (M-CSF; Macrophage-Colony Stimulating Factor) (Übersichtsartikel: Hamilton, 1993; Valledor et al., 1998; Auffray et al., 2009). Makrophagen sind demnach in der Lage, bis zu einem gewissen Grad ihren Phänotyp plastisch an äußere Umstände anzupassen. Die Erkennung der umliegenden Signale des Gewebes führt zur jeweils spezifischen Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und dadurch zu einer Änderung der Genexpression. Rezeptorvermittelt induzieren die Stimuli damit spezifische Makrophagen-Phänotypen, welche durch die Expression bestimmter Oberflächenmoleküle und Cytokine gekennzeichnet sind.

Das im Gewebe vorliegende Milieu aus Signalstoffen induziert die Polarisierung zu gegensätzlichen Makrophagen-Phänotypen zu (**Abbildung 4**). Die Wege der Ausbildung und Gewebe-Interaktion der verschiedenen Makrophagen-Subtypen ist *in vivo* noch nicht vollständig geklärt. Grundsätzlich werden Makrophagen jedoch in zwei Subpopulationen eingeteilt, unter anderem abhängig vom Modus der Aktivierung und der Funktion der Zellen. Die klassische Aktivierung von Makrophagen in Reaktion auf Pathogene oder Signalstoffe wie IFN  $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor alpha) bedingt die Differenzierung der Zellen einen sogenannten **M1-Phänotyp** (Übersichtsartikel: Rasmussen et al., 2009). M1-Makrophagen zeigen proinflammatorische Reaktionen und sezernieren z.B. die Cytokine TNF- $\alpha$  und Interleukin-6 (Übersichtsartikel: Sica et al., 2008). Die aktivierten M1-Makrophagen verstärken dadurch die Inflammation im betroffenen Gewebe. Zum Beispiel führt sezerniertes TNF- $\alpha$  zu einer Aktivierung weiterer Immunzellen, welche ebenfalls gegen





**Abbildung 4. Schematische Darstellung der Signal-induzierten Ausbildung von M1- und M2-Makrophagen-Phänotypen.** In Reaktion auf Pathogene (rosa) oder auf pathogen-assoziierte Signale wie LPS und IFN $\gamma$  aus T<sub>H</sub>1-Zellen wird ein proinflammatorischer M1-Phänotyp ausgebildet. Verschiedene Cytokine von T<sub>H</sub>2- oder T<sub>reg</sub>-Zellen oder Gewebe-Signale induzieren demgegenüber einen M2-Phänotyp, welcher in die Regeneration und Homöostase verschiedener Gewebe (gestrichelte Umrandung) durch die Sekretion von Cytokinen wie z.B. TGF $\beta$  involviert ist.

die eindringenden Pathogene und befallenen Wirtszellen vorgehen. Im Gegensatz zur obigen genannten klassischen M1-Aktivierung, führt die alternative Aktivierung durch verschiedene Stimuli zur Ausbildung eines **M2-Phänotyps**. Zur Differenzierung in M2-Makrophagen führen u.a. die Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13. Antiinflammatorische M2-Makrophagen sind auch in die Gewebe-Homöostase und die Regeneration bei Verletzungen involviert, z.B. durch die Sekretion von TGF $\beta$  (Verreck et al., 2006; Übersichtsartikel: Rodero and Khosrotehrani, 2010).

### 2.2.3 Die pro- oder antiinflammatorische Funktion von Makrophagen wird durch Stimulus-abhängige Transkriptionsmuster bestimmt

Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen konservierte, molekulare Muster mikrobieller Pathogene unter anderem durch Toll-ähnliche Rezeptoren (Toll like Receptors; TLR). Die Familie der TLRs besteht in Säugetieren aus 13 Mitgliedern, wobei der humane TLR11 nicht funktionell zu sein scheint (Übersichtsartikel: Uematsu and Akira, 2006). Zu diesen konservierten Mustern zählen u.a. bakterielle Oberflächenmoleküle wie

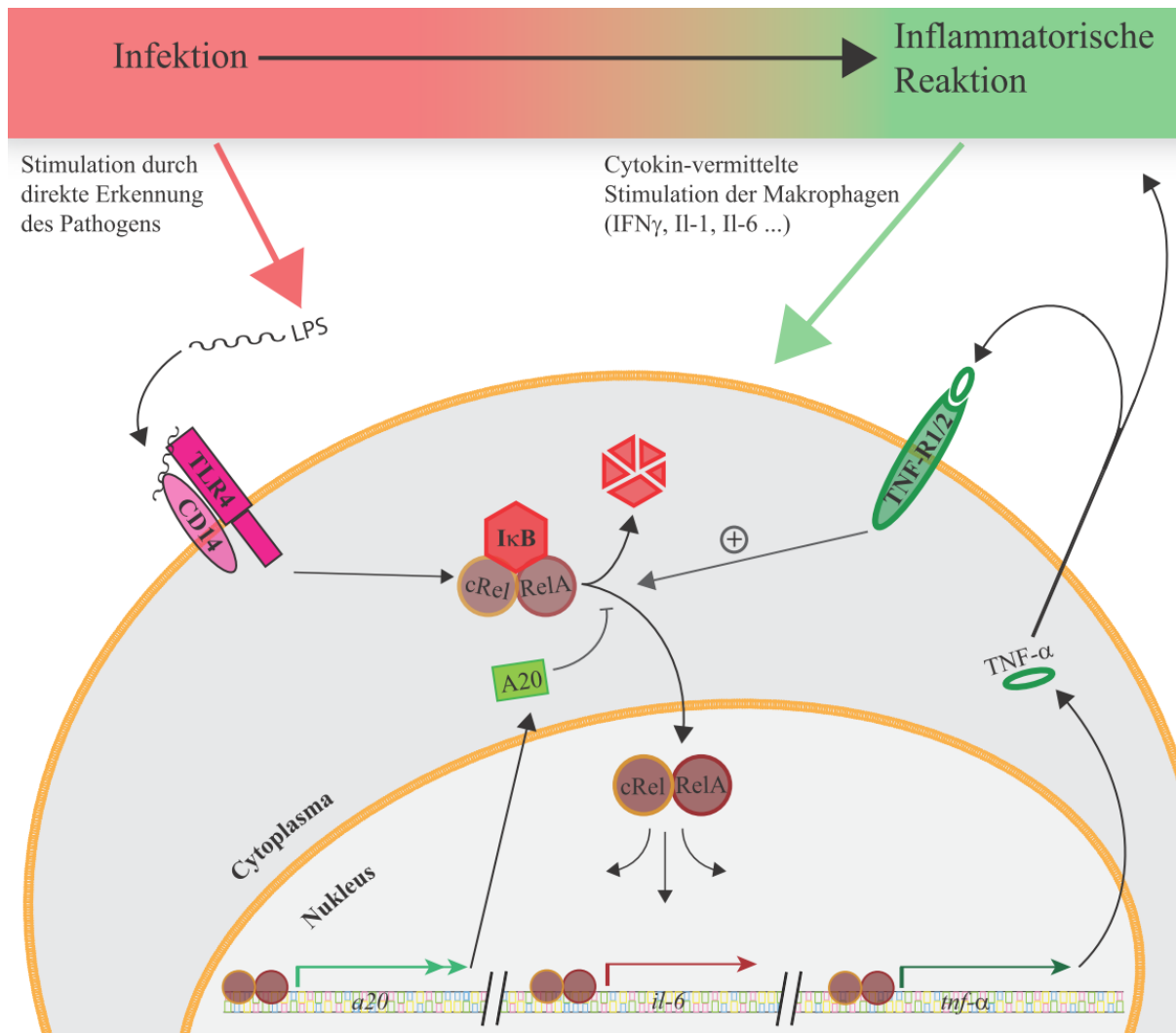
Lipopolysaccharide (LPS; gram<sup>-</sup> Bakterien) und Peptidoglykan (gram<sup>+</sup> Bakterien), unmethylierte CpG-DNA-Abschnitte aus Bakterien sowie einzelsträngige Virus-RNA (Übersichtsartikel: Akira et al., 2006). Durch die Erkennung der pathogenen Muster werden Makrophagen proinflammatorisch aktiviert und exprimieren verschiedene Mechanismen der Pathogen-Abwehr. So sezernieren aktivierte M1-Makrophagen verschiedenen Cytokine wie TNF- $\alpha$  und IL-6 und bilden zudem Sauerstoff- bzw. Stickstoffradikale aus, um Pathogene und nekrotische Zellen zu zerstören (Übersichtsartikel: Peralta et al., 2007).

Die Bindung der TLR-Liganden bedingt zudem die Aktivierung von cytoplasmatischen Proteinen der NF $\kappa$ B (nuclear factor kappa light chain enhancer in B cells)-Familie. Die NF $\kappa$ B-Familie setzt sich aus fünf DNA-bindenden Untereinheiten zusammen (RelA, RelB, cRel, p50, p52), welche spezifische Dimere ausbilden. Die Aktivierung der Makrophagen führt zur Phosphorylierung und Degradation von inhibitorischen  $\kappa$ B-Proteinen (I $\kappa$ B), was zur Freisetzung der cytoplasmatischen NF $\kappa$ B-Dimere und deren Translokation in den Nukleus führt (**Abbildung 5**). Hier binden die nukleären NF $\kappa$ B-Untereinheiten wie RelA und cRel als Aktivatoren an NF $\kappa$ B-Bindestellen in Promotoren zahlreicher Gene, wodurch spezifische Transkriptionsmuster initiiert werden (Übersichtsartikel: O'Dea and Hoffmann, 2010). I $\kappa$ B-Proteine werden wiederum resynthetisiert, inhibieren die Aktivität des DNA-gebundenen NF $\kappa$ B und sequestrieren es zurück in das Cytoplasma. Eine andauernde Stimulation der Makrophagen führt so zu einer wiederholten Degradation und Resynthese von I $\kappa$ B $\alpha$ . Dadurch bedingt die zyklische Inhibition von NF $\kappa$ B eine Oszillation der NF $\kappa$ B-Untereinheiten zwischen Cytoplasma und Nukleoplasma (Werner et al., 2012). Diese strikt regulierte NF $\kappa$ B-Aktivierung ist essentiell für die Regulation der Transkription während der inflammatorischen Reaktion (Übersichtsartikel: Sen and Smale, 2010).

Abhängig von Stärke und Dauer der Stimulation aktiviert die LPS-Erkennung durch TLR4 u.a. NF $\kappa$ B-RelA, welches in Makrophagen die geringe basale Transkription des Gens *a20* (*tnfaip3*, *tumor necrosis factor alpha induced protein 3*; Park et al., 2011; Liang et al., 2012) verstärkt und die Transkription von *tnf- $\alpha$*  (*tumor necrosis factor alpha*) und *il6* (*interleukin 6*) induziert (Westra et al., 2004). In Makrophagen inhibiert das A20-Protein wiederum die TNF- $\alpha$ -aktivierte Freisetzung des cytoplasmatischen NF $\kappa$ B-Dimers und reguliert auf diesem Weg die Reaktion der Zellen auf TNF- $\alpha$  (Werner et al., 2012). Die Stimulation durch TNF- $\alpha$  kann zudem die Apoptose induzieren, welche aber in einigen Zellen durch A20, vermutlich über die Regulation von NF $\kappa$ B, inhibiert werden kann (Verstrepen et al., 2010). Durch

Makrophagen sezerniertes TNF- $\alpha$  und IL-6 verstärken autokrin und parakrin die Inflammation im betroffenen Gewebe, vor allem durch Aktivierung weiterer Immunzellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems (Sherry and Cerami, 1988). Diese aktivierten Immunzellen bilden ebenfalls Signale aus, welche auf die Makrophagen rückwirken (Fearon and Locksley, 1996; Parker et al., 2007). Zum Beispiel sezernieren aktivierte T-Lymphozyten IFN $\gamma$ , welches die proinflammatorische Reaktion der Makrophagen verstärkt (Schroder et al., 2004). Proinflammatorische Cytokine wie TNF- $\alpha$  oder IFN $\gamma$  induzieren in Makrophagen die Ausbildung eines proinflammatorischen Phänotyps, u.a. gekennzeichnet durch die verstärkte Expression des CD14-Rezeptors und verschiedener proinflammatorischer Cytokine, einer verstärkten Phagocytose von mikrobiellen Pathogenen und verstärkter Präsentation pathogener Antigene (Martinez et al., 2009; Mantovani et al., 2004). So bildet sich ein Signalnetzwerk zwischen den Zellen des inflammatorischen Gewebes, welches die Inflammations-Reaktion verstärkt oder nach erfolgreicher Abwehr der Pathogene beendet.

Neben einer Funktion als Effektorzellen des angeborenen Immunsystems, stellen Makrophagen zudem Mediatoren verschiedener Cytokin- und Chemokin-Signale in der Gewebemöiostase dar (Gordon and Martinez, 2010). Dadurch sind Makrophagen z.B. an der Wundheilung und in Muskelwachstum und -Regeneration beteiligt (Martinez et al., 2009; Rodero and Khosrotehrani, 2010; Deng et al., 2012). Neuere Arbeiten zeigen, dass Stimuli wie IL-4, IL-10 und IL-13 die Entwicklung zu M2-Makrophagen bedingen. Diese Interleukine werden hauptsächlich durch T<sub>H</sub>2 und regulatorische T-Zellen sezerniert (siehe Absatz 2.2.1, Seite 13) und bedingen einen Makrophagen-Phänotyp, welcher eher modulierend oder supprimierend auf proinflammatorische-Reaktionen wirkt. Eine antiinflammatorische Stimulation von Makrophagen führt damit durch die Internalisierung oder dem Ausschluss von Transkriptionsfaktoren aus den Nukleus zu distinkten Transkriptionsmustern (Mantovani et al., 2004; Martinez et al., 2009). So inhibiert die Stimulation der Makrophagen durch IL-4, IL-10 und IL-13 die nukleäre Lokalisation von RelA wodurch die Expression proinflammatorischer Gene wie *tnf- $\alpha$*  und *il6* blockiert wird. Stattdessen aktivieren IL-4 und IL-13 den Aktivator STAT6, welcher notwendig ist für die Transkription verschiedener M2-typischer Gene (Biswas and Mantovani, 2010). So wird in M2-Makrophagen u.a. die Expression antiinflammatorischer Cytokine wie TGF $\beta$  und IL-10 aktiviert (Sica et al., 2008; Martinez et al., 2009). Durch die Sezernierung der verschiedenen Cytokine tragen M2-Makrophagen zum Beispiel in verletztem Gewebe zur Proliferation von Zellen sowie der Angiogenese und Geweberegeneration bei (Lovren et al., 2010).



**Abbildung 5. Schematische Darstellung der LPS-induzierten NFκB-Aktivierung mit folgender Transkription von *a20*, *interleukin 6 (il6)* und *tumor necrosis factor alpha (tnf-α)* in proinflammatorischen Makrophagen.** LPS-induziertes TNF-α bedingt autokrin die Transkription von *il6* und verstärkt die Transkription von *a20*. Cytoplasmatisches A20 inhibiert die NFκB-Aktivierung und damit die TNF-α-vermittelte Transkriptionsinduktion.

Das umgebende Signal-Mikromilieu kann auch dazu führen, dass Makrophagen Krankheitsbilder verstärken. In Tumorgewebe induziert die Sezernierung von IL-4, IL-10 und IL-13 die Ausbildung antiinflammatorischer M2-Makrophagen und führt dadurch u.a. zur Expression des immunsuppressiven Wachstumsfaktors TGFβ durch Makrophagen (Martinez et al., 2009). Sollten Makrophagen unter normalen Bedingungen Krebszellen attackieren, scheinen die Tumor-assoziierten M2-Makrophagen nicht gegen den Tumor gerichtet zu sein. Vielmehr stehen diese antiinflammatorischen Makrophagen im Verdacht, durch Ausschüttung von Cytokinen die Angiogenese, Zellproliferation und damit die Progression des Tumors weiter zu unterstützen (Sica et al., 2008).

### 3. Fragestellung

Die beschriebenen Funktionen von TAF4B in unterschiedlichen Zelltypen machen es zu einem interessanten Faktor, um die Regulation der Transkription durch Paraloge der basalen Transkriptionsfaktoren besser zu verstehen. Neuere Versuche deuten darauf hin, dass TAF4B nicht alleinig durch eine Promotorbindespezifität reguliert wird. Die Aktivierung der transkriptionellen Funktion von TAF4B scheint teilweise signalinduziert und zudem beeinflusst durch die Menge von nukleären TAF4B zu sein. Jedoch ist nicht klar, durch welche Mechanismen diese Aktivierung eingeleitet wird. Zudem wurde die direkte Promotorbindung von TAF4B lediglich *in vitro*, durch eine ektopische Inhibition des ubiquitären TAF4 oder in Krebszelllinien mit B- bzw. T-Zellcharakter aufgezeigt. Diese Versuche können damit artifizielle Ergebnisse erbracht haben, weswegen primäre Zellen grundsätzlich ein zu bevorzugendes Zellsystem darstellen. Durch die starke Differenzierung von primären Monozyten zu reifen Makrophagen sowie die Reaktivität der Zellen auf verschiedenste Stimuli ist es möglich das Verhalten des Transkriptionsfaktors in teilweise gut bekannten Parametern zu bestimmen. Zudem ist es möglich, durch verschiedene Stimuli die weitere Ausbildung distinkter Makrophagen-Phänotypen zu induzieren. Verschiedene der gezeigten TAF4B-Interaktionspartner wie RelA oder c-Jun werden ebenfalls in Makrophagen exprimiert. Zudem transkribieren Makrophagen bekanntermaßen verschiedene der bisher in Krebszelllinien gezeigten TAF4B-Zielgene, wie *a20*, *integrin $\alpha$ 6* und *c-jun* teilweise während der Differenzierung der Makrophagen oder nach einer distinkten Stimulation.

Eine transkriptionsregulatorische Funktion von TAF4B wurde bis jetzt in Zellen des adaptiven Immunsystems aufgezeigt. In dieser Arbeit soll eingangs bestimmt werden, ob TAF4B und TAF4 in Makrophagen, Zellen des angeborenen Immunsystems exprimiert werden. Zudem soll untersucht werden, inwieweit die gut untersuchten Signalwege stimulierter Makrophagen eine Auswirkung auf die Funktion von TAF4B haben. Welche Faktoren könnten eine Auswirkung auf die nukleäre Anreicherung von TAF4B besitzen?

Während Krebszelllinien bekanntermaßen eine fehlregulierte Transkription aufweisen, gilt dies nicht für primäre Zellen. Die Bindung von putativen Zielgenen durch endogenes TAF4B sollen aus diesem Grund in primären Makrophagen aufgezeigt werden. Können möglicherweise Hinweise auf die Art der Zielgenspezifität von TAF4B gefunden werden?

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Abkürzungen

ChIP= Chromatin-Immunpräzipitation

Bp= Basenpaare

BSA= Rinder-Serumalbumin

IF= Immunofluoreszenz

H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>= Doppelt destiliertes Wasser

kBp= 1000 Basenpaare

MP= Milchpulver

PBMCs (*Peripheral blood mononuclear cells*)= Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes, d.h. dendritische Zellen, Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen.

PBS<sub>def</sub>= PBS (Phosphat Buffered Saline) ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (PAA; H15-002)

PBS<sup>++</sup>= PBS mit Ca<sup>2+</sup>/Mg<sub>2</sub>; PAA (H15-001)

PCR= Polymerase-Ketten-Reaktion

rpm= Rounds per minute

WB= Western-Blot

### 4.2 Geräte und Materialien

BD FACSCalibur Flow Cytometer: 4-Color; BDBiosciences; 342975

Biofuge pico; Heraeus Instruments

Biofuge fresco; Heraeus Instruments

Biometra UVsolo; Mitsubishi

Block-Heater H250;Roth

Entwickler CURIX 60; AGFA

Fast Optical 96 Well Reaction-Plate with Barcode (0,1 ml); Applied Biosystems; 4346906

Fluoreszenzmikroskop Axioplan2 imaging; Zeiss

Hyperfilm ECL 18x24cm; GE Healthcare; 28906837

Inkubator HERA cell; Heraeus Instruments

Megafuge 1.0R; Heraeus Instruments

Mikroskop-CKX41; Olympus

Mini Tank Blot Cell; BioRad

Personal Cyclor; Biometra

Petrischalen 92x16cm (ohne Nocken); Sarstedt; 821472001

Sonifier W-250D Microtip: MAX. 70 % Amplitude; Branson

Photometer Biomate 3; Thermo Fisher Scientific

ULTRAFREE-MC, Durapore PVDF 0,45µm; Millipore; UFC30HV25

Zentrifuge J2-21 M/E Beckmann Culture GmbH

24-Well-Platten; Sarstedt; 83.1836

7500 Fast Real-Time PCR System; Applied Biosystems

### 4.3 Kits, Enzyme, Marker

Accu Prime Taq Hifi; Invitrogen; 12346-086

AMAXA Human Macrophage Nucleofector Kit; Dharmacon/ThermoFisher; VAPA-1008

High Fidelity Taq; Invitrogen; 11304-011

Omniscript RT Kit; Qiagen; 205111

One Step RT-PCR Kit; Qiagen; 210210

PageRuler Prestained Protein ladder; Fermentas; SM0671

Proteinase K; Fermentas; E00491

Protein GPlus ProteinA Suspension; Calbiochem; IP05

Power SYBR Green PCR Mix; Applied Biosystems; 4367659

Qiaquick PCR Purification Kit; Qiagen; 28104

Rapid Step ECL Reagent; Calbiochem; 345818

RNAeasy Mini; Qiagen; 74104

RNAse; Roche; 11119915001

RNAse free DNA Set; Qiagen; 79254

Velocity Taq; Bioline; BIO-21098

2-log DNA ladder; BioLabs; N3200L

### 4.4 Chemikalien, Lösungen und Zellkulturreagenzien

Bovines Serum Albumin (BSA); Sigma Aldrich; A9418-10G

CHAPS; Sigma Aldrich; C3023-1G  
Fetale Bovine Serum (FBS); PAA; A15-101  
Fluoromount G; Southern Biotech; 0100-01  
Formaldehyd (37%); Sigma; 25,254-9  
Humanes AB-Serum; PAA; C11-021  
Interleukin 4 (human); PeproTech; 200-04  
Interleukin 10 (human); PeproTech; 200-100  
Interleukin 13 (human); PeproTech;  
L-Glutamine; Biochrom; KG:K0202  
Lipopolysaccharide (LPS);  
LSM 1077; PAA; J11-004  
MEM Vitamins; Gibco; 11120-37  
Natrium Pyruvat; Gibco; 11360-039  
Normal Goat Serum (NGS); Vector Laboratories; S-1000  
PBS (Phosphat Buffered Saline) ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}_2$ ; PAA; H15-002  
PBS mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}_2$ ; PAA; H15-001  
Penicillin-Streptomycin; Gibco; 15140-122  
PMA; Calbiochem; P8139 Sigma  
RPMI1640; PAA; E15-041  
Serum Albumin Fraktion V; Roth; 8076.3  
TRITON X100; Roth; 3051.2  
TRIZOL-Reagenz; ; 15596-026  
TWEEN20; Roth; 9127.2  
2-Mercaptoethanol; Gibco; 31350-010

### Allgemeine Pufferlösungen:

PBS:	TBS (Tris Buffered Saline):	TBSTT:
137 mM NaCl	10 mM TRIS	TBS
2,7 mM KCl	150 mM NaCl	+ 0,05 % Tween 20
10 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4$		+ 0,2 % Triton X-100
2 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$		



## 4.5 Antikörper, IgGs

**Tabelle 1. Primäre Antikörper**

Antikörper	Herkunft	Artikelnummer/ Referenz	Eingesetzte Verdünnung
anti aktive RNA Polymerase II	Maus	Covance; MMS- 134R; Klon H14	IF 1:75
anti Aktin	Kaninchen	SantaCruz; sc-1616R	WB: 1:5000 (5% BSA)
anti CD14 FITC gekoppelt	Maus	SantaCruz; sc-1182	Durchflusszytometrie: 5µl/ 1ml Pufferlösung
anti c-Rel	Kaninchen	SantaCruz; sc-71 Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Alexander Visekruna	IF: 1:300 ChIP: 4µg/IP
anti Histone H3	Kaninchen	ABCAM; ab1791	ChIP: 4µg/IP
anti Fibrillarin	Maus	Antikörper- Online; ABIN398380	IF: 1:250
anti Kaninchen- Immunglobuline	Kaninchen	ABCAM; ab46540	ChIP: 4µg/IP IF: 1:500
anti LaminA/C	Kaninchen	Cell Signaling; 2032	WB: 1:1000 (5 % MP)
anti RelA	Kaninchen	SantaCruz; sc-372	ChIP: 4µg/IP IF: 1:500 WB: 1:1000 (5% BSA)

anti TAF4	Maus	SantaCruz; sc-736	IF: 1:300
anti TAF4B1536	Kaninchen	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von R. Dikstein (Dikstein et al., 1996)	ChIP: 3µl/IP IF: 1:1000 WB: 1:2000(5%MP)
anti TAF4B1537	Kaninchen	Siehe α-TAF4B1536	WB: 1:1000 (5% MP)

Tabelle 2. Sekundäre Antikörper

Antikörper	Herkunft	Artikelnummer/ Referenz	Eingesetzte Verdünnung
Cy3 anti Kaninchen			IF: 1:200
Cy2 anti Maus			IF: 1:100
anti Kaninchen Peroxidase gekoppelt			WB: 1:5000
anti Maus Peroxidase gekoppelt			WB: 1:1000

## 4.6 Oligonukleotide

Tabelle 3. Oligonukleotide

Name	Sequenz 5'-3'
a20ChIPfw.1	CAGCCCGACCCAGAGAGTCAC
a20ChIPrev.1	CGGGCTCCAAGCTCGCTT

a20RTfw.1	TGGAAAGCCAGAAGAAACTCA
a20RTrev.1	CGCCTTCCTCAGTACCAAGT
a20_3'UTRChIPfw.1	AACTGGCAAGGGATGATGTC
a20_3'UTRChIPrev.1	CACGCGACTTGTGTGTCTTT
il6RTfw.1	GAAAGCAGCAAAGAGGCACT
il6RTrev.1	TTTCACCAGGCAAGTCTCCT
Oligo-dt	TTTTTTTTTTTTTTTT (15 x T)
RTtaf4fw.1	GCCACGGAAACTATGGAAAA
RTtaf4rev.1	TGCACGAGCTCTTTCACATT
taf4BflvarRTfw.1	GCAAATTACTCTGCCTGGAAA
taf4BflRTrev.1	CATCCTCATCTCGGAAGCAT
taf4BvarRTrev.1	AAGTAGACCGGAAGCATGATGT
taf4BRTfw.1	CCACAGGCAGTTCAAGTCAA
taf4BRTrev.1	TTCACTGGCATCGTCTTCTG
tnf-aaChIPfw.1	CGCTGGTTGAATGATTCTTTCC
tnf-aaChIPrev.1	GCTGGTCCTCTGCTGTCCTT
tnf-aaRTfw.1	AGCCCATGTTGTAGCAAACC
tnf-aaRTrev.1	TGAGGTACAGGCCCTCTGAT
XS13MenschMausfw	TGGGCAAGAACACCATGATG
XS13MenschMausrev	AGTTTCTCCAGAGCTGGGTTGT

## 4.7 Zellkulturmethoden

### 4.7.1 Zellkulturmedien

Medium für humane, primäre Monozyten bzw. Macrophagen:

RPMI 1640 (ohne Glutamin)

+ Hepes (im Medium enthalten)

- + 2 mM L-Glutamine (200 mM)
- + 100 U/ml Penicillin (5 ml aus 10000 Units/ 10 mg/ml, PAA), 100 µg/ml Streptomycin (5 ml aus 10000 Units/ 10 mg/ml, PAA)
- + 5 ml Aminosäuren (100x, PAA)
- + 5 ml Natriumpyruvat (100mM)

### 4.7.2 qIsolation, Kultivierung und Stimulation von primären humanen Monozyten

Für die Aufreinigung von humanen primären Monozyten wurde in dieser Arbeit Buffy coats der Blutspendebank Gießen verwendet. Die Zellen wurden während des gesamten Ablaufs auf Eis gehalten. Zudem wurde während der Aufreinigung und Kultivierung der Monozyten bzw. Makrophagen strikt darauf geachtet, eine mögliche Kontamination der Zellen zu vermeiden. Ein Buffy coat stellt eine Blutfraktion dar, in welcher weiße Blutkörperchen und Blutplättchen angereichert sind. In einem ersten Aufreinigungsschritt wurden PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) über einen Ficoll (LSM1077) -Gradienten aus dem Buffy coat aufgereinigt. PBMCs sind eine Blutzellpopulation bestehend aus B- und T-Lymphozyten, Granulozyten, dendritischen Zellen und Monozyten. Aus den erhaltenen PBMCs wurden anschließend durch das Elutrationen-Verfahren Monozyten isoliert (Yasaka et al., 1981).

Für die **Aufreinigung der PBMCs durch einen Ficoll-Gradienten** (Amersham Biosciences Handbook, „Ficoll-Paque PLUS For in vitro isolation of lymphocytes“, 2001) wurde der Buffy coat (ca. 65-70ml) auf drei 50 ml-Falcon-Gefäße aufgeteilt, in welche jeweils 20 ml-Ficoll vorgelegt wurden. Es wurde darauf geachtet, dass der Buffy coat auf das Ficoll geschichtet wurde ohne sich mit diesem zu vermischen. Anschließend wurde der Ansatz für 30 min. bei 21°C und 600-700 x G, ohne Bremse zentrifugiert. Die angegebene Beschleunigung muss dabei auf die Ficoll-Buffy coat-Grenzfläche wirken. Hierfür wurde der Radius zwischen Zentrifugen-Zentrum und Ficoll-Buffy-Grenzfläche ausgemessen und abhängig vom Zentrifugentyp die notwendige Umdrehungsgeschwindigkeit errechnet. Nach der Zentrifugation wurde das überstehende Plasma soweit wie möglich abgenommen und der entstandene Leukozyten-Ring in 50ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ , eiskalt) vorsichtig resuspendiert. Anschließend wurden die Leukozyten zentrifugiert (200-250xG, 4°C, 10min., ohne Bremse), nochmals in 50ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}_2$ , eiskalt) gewaschen und zentrifugiert. Das Leukozytenpellet wurde dann in 30 ml PBS (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}_2$ , eiskalt) gelöst und darauf

folgend elutriert. Für die **Elutriation der Monozyten aus PBMCs** wurde der Elutriator am Vortag mit 500 ml sterilem H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> gespült. Währenddessen wurde der Elutriator kurz angeschaltet um das System auf eventuelle Lecks während der Zentrifugation zu überprüfen. Ein Schema des Elutriationssystems ist im Anhang zu finden (siehe Abbildung 25). Im Anschluss wurde der Elutriator mit 250 ml Wasserstoffperoxid-Lösung (6 % in sterilen H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>) gespült und für 30- 45 min. inkubiert. Folgend wurde das System wiederum mit 500 ml H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> gespült und geeicht. Für die Kalibrierung wurde steriles H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> in das Elutriationssystem eingepumpt. Bei konstanten 3000 rpm wurde die Pumpleistung bestimmt welche notwendig war um 27,5 ml/min durch das System zu pumpen. Diese Pumpleistung wurde im Elutriationsprotokoll vermerkt und stellt den letzten Elutriationsschritt dar, siehe **Tabelle 4** („Kalibrier-Schritt“). Am folgenden Tag wurden die PBMCs, welche durch den Ficoll-Gradienten isoliert wurden, in die Elutriations-Kammer des Rotors gepumpt. Nachfolgend wurden sie mit konstanter Geschwindigkeit (3000 rpm) des Elutriators bei steigender Pumpleistung der Pumpe elutriert.

**Tabelle 4 Beispiel eines Elutriationsprotokolls**

Pumpleistung (Potentiometeranzeige)	Zeit/ Schritt (min.)
100	Hier PBMCs einziehen und weitere 15 min. elutrieren
200	5
250	5
300	4
350	4
450	3
480	3
500	3
510	3

520	4 (Kalibrier-Schritt)
660	Rotor ausschalten und 100 ml des Elutriats auffangen

Das in Tabelle 4 dargestellte Elutriationsprotokoll stellt ein Beispiel dar. Durch die Erschlaffung der Schläuche im System muss der Eichschritt und damit nach einiger Zeit das komplette Protokoll neu angepasst werden. Bei einem Neueinbau von Schläuchen wurde von Herrn Andreas Kaufmann (AG Bauer BMFZ) zudem ein vollständig neues Elutriationsprotokoll erstellt. Die Monozyten wurden nach der Elutration bei 1200 rpm, 10 min., 4 °C zentrifugiert und in 10 ml eiskaltem PBSdef. resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl wurde weitergehend die Reinheit der Monozyten bestimmt (siehe Abschnitt 4.7.4 Durchflusszytometrie) und die Zellen nachfolgend kultiviert.

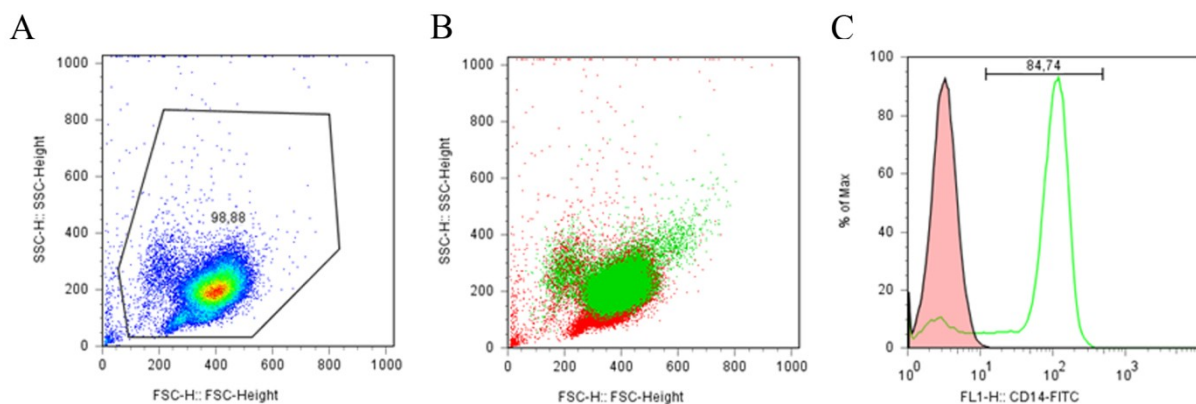
#### **4.7.3 Kultivierung und Stimulation von primären humanen Monozyten bzw. Makrophagen**

Die isolierten Monozyten wurden in RPMI-Medium + 2 % humanes AB Serum aufgenommen und abhängig von der Fläche ausgesät. Hierzu wurden pro Well einer 24-Well-Platte  $0,5 \times 10^6$  Zellen in 0,5 ml Medium auf Deckgläschen und  $10 \times 10^6$  Zellen in 10 ml Medium / Ø 10 cm Petrischale ausgesät. Nach 1 Stunde wurde das Medium vollständig abgenommen und frisches RPMI + 5 % humanes AB Serum auf die mehrheitlich adhärenen Zellen gegeben. Nach fünf Tagen wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch frisches PPMI (+ 5 % humanes AB Serum) ersetzt.

Die Makrophagen wurden zudem mit verschiedenen Stimuli behandelt. Mit bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS, 100ng/ml), Interferon gamma (IFN $\gamma$ , 10 ng/ml), Interleukin-4, 10 oder 13 (jeweils 20ng/ml). Die Stimuli wurden in Medium verdünnt, zu den definierten Endkonzentration in die kultivierten Zellen getropft und die Zellen kurz geschwenkt. Nach der jeweiligen Stimulationsdauer wurden die Zellen weiter verwendet.

#### 4.7.4 Durchflusszytometrie

In der Durchflusszytometrie werden Zellen hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom an einem Laserstrahl vorbeigepumpt, so dass auf diese Weise Größe, Form und Granularität der Zellen gemessen werden kann. Sind die Zellen Fluoreszenz-markiert kann auch diese Markierung spezifisch detektiert werden. Zudem kann mit dieser Methode die Reinheit einer Zellpopulation bestimmt werden. Da jeder Zelltyp der heterogenen PBMC-Zellpopulation eine spezifische Morphologie und Oberflächenmolekülspektrum besitzt war es mittels Durchflusszytometrie möglich die Reinheit der isolierten Monozyten zu bestimmen. Hierfür wurden elutrierte Monozyten mit anti-CD14-FITC gekoppelten Antikörper inkubiert. Im Vergleich zu anderen PBMCs exprimieren Monozyten und Makrophagen den CD14-Rezeptor stark angereichert auf der Zelloberfläche, was es ermöglicht Monozyten spezifisch für die Durchflusszytometrie fluoreszent zu markieren (Paulnock, 2006). Ein stellvertretendes Beispiel für die Auswertung einer Analyse der Durchflusszytometrie ist in **Abbildung 6** dargestellt.



**Abbildung 6. Beispiel der Auswertung einer Durchflusszytometrie humaner primärer Monozyten.** **A)** Streudiagramm der gesamten elutrierten Zellpopulation, ohne Darstellung der spezifischen Fluoreszenz des verwendeten CD-14-Antikörpers, nach Granularität (SSC-High) und Zellgröße (FSC-High) der Zellen. **B)** Streudiagramm der CD-14-positiven Zellpopulation (grün) in der gesamten elutrierten Zellpopulation (rot). **C)** Vergleichende Darstellung der Stärke des gemessenen Fluoreszenzwertes (FL1H-CD14-FITC) der gesamten gemessenen Ereignisse (% of max) elutrierter Zellen welche nicht mit dem CD-14-Antikörper behandelt wurden (rot) und der CD-14-Antikörper-behandelten Zellen (grün) derselben elutrierten Zellpopulation, zum Aufzeigen des spezifischen CD-14-Antikörpersignals. 84, 74 % der Zellen dieser elutrierten Zellpopulation waren CD14-positiv.

Für die Durchführung der Durchflusszytometri zure CD-14-Markierung der Monozyten wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen einmal in 1 ml FACS-Buffer (2 % FBS+2 mM EDTA in PBSdef,

eiskalt) gewaschen und mit 2000 rpm (Tischzentrifuge) bei 4 °C, 5 min. abzentrifugiert. Folgend wurden die Zellen in 1 ml FACS-Puffer + 5 µl anti CD14-FITC resuspendiert und für 20 min. abgedunkelt bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen nochmals in 1 ml FACS-Puffer gewaschen, in 500 µl FACS-Puffer gelöst und für die Durchflusszytometrie verwendet. Als Negativ-Kontrolle für die Fluoreszenz-Messung wurden Zellen parallel ohne CD14-FITC-Antikörper behandelt.

## 4.8 Molekularbiologische Methoden

### 4.8.1 RNA-Isolierung

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurde das RNAeasy-Kit von Quiagen nach Herstellerangaben verwendet. Um eine eventuelle DNA-Kontamination auszuschließen wurde zudem ein Verdau mit RNase-freier DNase (Quiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Alle Zentrifugationschritte der RNA-Isolation fanden bei 10000 rpm (Tischzentrifuge) statt. Schwimmende Zellen (PBMCs und Monozyten) wurden dreimal in eiskaltem PBSdef gewaschen, jeweils mit 2000 rpm, 5 min. bei 4 °C mit abzentrifugiert und dann abhängig von der Zellzahl in RLT-Puffer aufgenommen (siehe RNAeasy-Protokoll). Adhärente Zellen wurden auf der Petrischale mit PBSdef gewaschen und dann direkt in RLT-Puffer aufgenommen. Die lysierten Zellen wurden auf Eis mit einer 0,7 mm-Syringenadel resuspendiert. Die isolierte RNA wurde zuletzt zweimal 1 min. in 30 µl RNase-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die RNA wurde bei - 80 °C gelagert.

### 4.8.2 Synthese von cDNA aus RNA

Für die Synthese von copy DNA (cDNA) wurde das Omniscript-Kit (Quiagen) mit Oligo-dT-Primern nach Herstellerangaben verwendet. Es wurden 200 – 1000 ng Gesamt-RNA für die Synthese-Reaktion eingesetzt. Zur Auflösung komplexer RNA-Strukturen wurde vor der cDNA-Synthese die verwendete RNA für 5 min. bei 65 °C erhitzt.



### 4.8.3 Protein-Extraktion

#### RIPA-Lyse-Puffer

50 mM TRIS-HCl pH 7,8

150 mM NaCl

1 % NP40

0,1 % Sodiumdodecylsulfat (SDS)

0,5 % Natrium-Deoxycholat

1 mM Dithiothreitol DTT (Zugabe kurz vor Verwendung)

1:100 Proteinase Inhibitor Cocktail (7fach Stammlösung) (Zugabe kurz vor Verwendung)

1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) (Zugabe kurz vor Verwendung)

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus Monozyten bzw. Makrophagen wurde 1 ml eiskalter RIPA-Lysepuffer pro  $10 \times 10^6$  Zellen eingesetzt (Proteinase Inhibitor Mix 1:100, 1 mM PMSF 1 mM DTT wurden vorher frisch zugegeben). Schwimmende Zellen (PBMCs, Monozyten) wurden zweimal in eiskaltem PBSdef gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer resuspendiert. Adhärenente Zellen wurden ebenfalls zweimal in eiskaltem PBSdef gewaschen, in RIPA-Puffer abgeschabt und anschließend resuspendiert. Die Zellen wurden daraufhin entweder für 30 min. bei 4 °C rotiert oder auf Eis alle 10 min. resuspendiert. Nach der Zelllyse wurde der Zelldebris bei 13000 rpm, 4 °C, für 15 min. abzentrifugiert und die Protein-Konzentration des Überstandes durch die Bradford-Methode bestimmt (Bradford, 1976).

### 4.8.4 Cytoplasma-Nukleoplasma-Fraktionierung

#### Puffer A1

10 mM Hepes-KOH pH 7,9

10 mM KCl

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

#### Puffer B

20 mM Hepe-KOH pH 7,9

400 mM NaCl

1,5 mM MgCl<sub>2</sub>

0,5 mM DTT	0,5 mM DTT
0,04 % NP-40	0,2 mM EDTA
	0,5 % NP-40
<b>Puffer A2</b>	2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
Puffer A1, ohne NP-40	150 mM Natriumfluorid

Proteinase-Inhibitor-Cocktail (7 fach Stammlösung) 1:100 und 1 mM PMSF wurden kurz vor der Verwendung in jeden Puffer zugegeben. Für die Fraktionierung des Zyto- und Nukleoplasmas wurden die Zellen zweimal auf der Petrischale mit eiskaltem PBSdef gewaschen. Die Zellen einer Petrischale wurden dann mit einem Zellkratzer direkt in 180 µl A1 gekratzt (eiskalt) und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Während der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal angeschnippt. Folgend wurden die Zellen mit 2000 rpm (Tischzentrifuge), fünf Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand, der die Zytoplasma-Fraktion enthält, wurde abgenommen und auf Eis gelagert. Das Pellet wurde vorsichtig in 500 µl A2 resuspendiert, erneut abzentrifugiert (2000 rpm, 4 °C, 5 min.) und in 360 µl Puffer B resuspendiert. Zur Nuklei-Lyse wurde der Ansatz nun 20 min. bei 4 °C, rotierend inkubiert und dann mit 13000 rpm bei 4 °C für 7 min. abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die nukleäre Fraktion und wurde zusammen mit der cytoplasmatischen Fraktion bei - 20 °C oder - 80 °C (Langzeitlagerung) gelagert.

Der spezifische Proteinnachweis in den einzelnen Zellplasmafraktionen wurde durch einen Western-Blot durchgeführt. Hierfür wurden die Antikörper gegen TAF4B und RelA gemeinsam inkubiert (siehe „**Proteindetektion durch Western-Blot**“, Seite 36). Vor der nachfolgenden Immundetektion von Lamin bzw. αTubulin wurde die Western-Blot-Membran gestrippt.

### 4.8.5 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCRs) und statistische Auswertung

Zur Quantifizierung der relativen Menge spezifischer Transkripte aus cDNA (siehe Abschnitt 4.8.2) oder zur Quantifizierung der Anreicherung spezifischer DNA-Abschnitte in ChIPs (siehe Abschnitt 4.8.8) wurden quantitative Echtzeit-PCRs durchgeführt (qRT-PCRs). Der fluoreszierende Farbstoff bindet in jeder Polymerisationsphase eines PCR-Zyklus ausschließlich an neu amplifizierte doppelsträngige DNA (dsDNA)- Fragmente. Während der exponentiellen Phase der PCR, kann so die relative Menge an Amplikons im Bezug auf eine

Referenz bestimmt werden. Für die qRT-PCR wurde ein kommerziell erhältlicher Reaktions-Ansatz (POWER SYBR Green; Applied Biosystems) in einem „7500 Fast Real-Time PCR System“ (Applied Biosystems) verwendet. Das verwendete qRT-PCR-Programm ist in Tabelle 5 dargestellt:

**Tabelle 5. Programm des qRT-PCR-Gerätes (Standard 7500-Modus)**

Stadium	Wiederholung	Temperatur	Zeit	Rampen-Rate
1	1	50.0 °C	02:00	100
2	1	95.0 °C	10:00	100
3	40	95.0 °C	00:15	100
		60.0 °C	01:00	100
4 (Dissociation)	1	95.0 °C	00:15	Auto
		60.0 °C	01:00	Auto
		95.0 °C	00:15	Auto
		60.0 °C	00:15	Auto

PCR-Reaktionsansatz:

10 µl 2xPOWER SYBR GREEN

3,64 µl H<sub>2</sub>O

0,18 µl Primer (10 mM)

0,18 µl Primer (10 mM)

14 µl

+ 6 µl cDNA (1:20 bis 1:60 in H<sub>2</sub>O)

In qRT-PCRs zur Detektion von Transkripten in cDNA wurde *xs13* als Referenz-Transkript verwendet. Die Anreicherung spezifischer DNA-Abschnitte in ChIPs wurde relativ im Verhältnis zum jeweiligen Input-Material berechnet. Berechnung des  $\Delta C_t$  und des Umkehrwertes:

$$\Delta C_t = C_t^{\text{Spezifische Immunopräzipitation}} - C_t^{\text{Eingangsmaterial 1:10}}$$

Relatives Menge der präzipitierten DNA =  $1/(2^{\Delta Ct})$

Für die Auswertung der qRT-PCR wurde jedes Zieltranskript bzw. jeder Ziel-DNA-Abschnitt pro Versuchsbedingung in mindestens drei unabhängigen Versuchen nachgewiesen, wobei jede PCR als Triplikat durchgeführt wurde und hier der Mittelwert für die Auswertung verwendet wurde. Die jeweilige Standardabweichung wurde in Excel automatisch durch die folgende Formel berechnet:

$$\sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

#### 4.8.6 Proteindetektion durch Western-Blot

Um spezifisch Proteine in Proteinextrakten aus gesamten Zellen oder Zellplasmafraktionierungen zu detektieren, wurden diese über die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt (Laemmli, 1970). Im Ladepuffer ist DTT enthalten welches Disulfidbrücken in Proteinen reduziert und so eine Auflösung von Sekundär- und Tertiärstrukturen bedingt. Zusätzlich wurden durch Aufkochen, Sekundär- und Tertiärstrukturen aufgelöst. Im Ladepuffer und in beiden Gelabschnitten des Polyacrylamidgels ist zudem SDS enthalten, ein anionisches Detergenz, welches sich an die Proteine anlagert und deren Eigenladungen überlagert. Das Polyacrylamid-Gel bildet auspolymerisiert abhängig von der Acrylamidkonzentration im Gel Netzstrukturen aus. So ist es möglich, Proteine unabhängig von Struktur und isoelektrischem Punkt in einem elektrischen Feld ihrer Masse nach aufzutrennen. Die Glasscheiben der Western-Blot-Apparatur wurden mit 70- und 90% EtOH gereinigt und zusammengebaut. Das Trenngel wurde zuerst zwischen die Glasscheiben der Apparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach 15 min. wurde der Isopropanol abgenommen und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen. Für Ansätze des Trenngels und Sammelgels siehe Tabelle 6 und Tabelle 7.

**Tabelle 6. Zusammensetzung des Trenngels, abhängig von der Acrylamid-Konzentration (Rezept für zwei Gele)**

Acrylamid-Konz.	12,5%	10%	8%
Acrylamid (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	4,15ml	3,33 ml	2,67 ml
1 M TRIS-HCl (pH 8,8)	3,75 ml	3,75 ml	3,75 ml
H <sub>2</sub> O	1,95 ml	2,77 ml	3,43 ml
SDS (10% in H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> )	100 µl	100 µl	100 µl
APS (10% in H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> )	140 µl	140 µl	140 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

**Tabelle 7. Zusammensetzung des Sammelgels (Rezept für zwei Gele)**

Acrylamid (30 % Acrylamid, 0,8 % Bisacrylamid)	0,65 ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	0,63 ml
H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub>	3,7 ml
SDS (10% in H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> )	50 µl
APS (10% in H <sub>2</sub> O <sub>bd</sub> )	50 µl
TEMED	5 µl

Vor dem Beladen des SDS-Gels wurde das Proteinextrakt 5 min. bei 95 °C in SDS-Ladepuffer denaturiert. Während des Gellaufs des SDS-Gels wurden pro Gel vier Whatman-Paper und eine Nitrozellulose-Membran auf Gelgröße zurecht geschnitten. Die Membran wurde für 10 min. in H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> aktiviert und dann zusammen mit den Whatman-Papieren in Tankblot-Puffer gelagert. Nachdem die Proteine auf dem SDS-Gel aufgetrennt waren, wurde

das SDS-Gel für 5 min. in Tankblot-Puffer gelegt. Darauf folgend wurde der Tankblot wie in Abbildung 5 dargestellt zusammengebaut.



**Abbildung 7. Schematische Darstellung des Aufbaues eines Western-Blots.**

Die Proteine wurden für 16-20 Stunden bei 40 V und 4°C auf die Membran transferiert. Die Membran wurde anschließend 10 min. in TBS gewaschen und abhängig vom primären Antikörper in 5 % BSA/TBS oder 5 % Milchpulver/TBS bei Raumtemperatur für eine Stunde geblockt. Nach dem Blockschrift wurde die Membran für 10 min. in TBSTT und folgend in TBS gewaschen. Für die spezifische Detektion von Proteinen wurde die Membran bei 4 °C in 5% BSA/TBS oder 5% MP/TBS inkubiert, in welchen der primärer Antikörper verdünnt wurde (Verdünnung siehe Tabelle 1. Primäre Antikörper). Im Fall einer gemeinsamen Detektion von TAF4B und Aktin wurden die jeweiligen Antikörper zusammen inkubiert. Nach 16 Stunden wurde die Membran zweimal 10 min. in TBSTT, folgend in TBS gewaschen und schließlich für 45 min. in verdünntem, sekundären Peroxidase-gekoppelten Antikörper inkubiert (Verdünnung siehe Tabelle 2. Sekundäre Antikörper). Die Membran wurde viermal 10 min. in TBSTT gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit ECL-Reagenz behandelt. Nach 1 min. Inkubation wurde das Reagenz von der Membran abgetropft und die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen. Das ECL wurde durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase umgewandelt wodurch Chemielumineszenz entstand. Das emitierte Lumineszenzsignal wurde dann mit einem sensitiven Film detektiert.

### 4.8.7 Zelluläre Proteinlokalisierung durch Immunofluoreszenz

Durch Immunofluoreszenz wurde die spezifische, zelluläre Lokalisation verschiedener Proteine bestimmt. Hierfür wurden auf Runddeckgläschen adhärente Zellen dreimal mit

eiskaltem PBS<sup>++</sup> gewaschen. Die Schritte, wenn nicht anders angegeben, fanden direkt in den 24-Well- oder 12-Well-Platten statt. Darauf folgend wurden die Zellen 10 min. bei Raumtemperatur, in 4 % Formaldehyd + 2 % Sucrose/PBSdef fixiert. Danach wurden die Zellen sofort dreimal mit eiskaltem PBSdef gewaschen und mit 0,15 % TRITON-X100/PBSdef für 10 min. permeabilisiert. Der sofort darauf folgende einstündige Blockschrift wurde mit 10 % NGS+10 % AB Serum+10 % FBS in 0,05 % TWEEN/ PBSdef bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Inkubation der Zellen im primären Antikörper (in Blocklösung) fand über Nacht, bei 4 °C in einer Feuchtekammer auf Parafilm statt. Hierzu wurden 20 µl des primären Antikörpers in einem Tropfen auf den Parafilm gegeben. Die Deckgläschen wurden so auf den Tropfen gelegt, dass die adhären fixierten Zellen in der Antikörperlösung inkubiert wurden. Im Falle von Ko-Immunofluoreszenz-Färbungen wurden beide primäre Antikörper zusammen in Lösung gegeben. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal in 0,05 % TWEEN/PBSdef gewaschen. Die Inkubation der Zellen im sekundären Antikörper (in Blocklösung) fand für eine Stunde bei Raumtemperatur in der Feuchtekammer statt. Im Falle von Ko-Immunofluoreszenz-Färbungen wurden beide sekundäre Antikörper zusammen in Lösung gegeben. Nachfolgend wurden die Deckgläschen dreimal in 0,05 % TWEEN gewaschen. Die Zellen wurden dann zwecks Färbung der DNA in 20 µl DAPI-Farbstoff (1:200) in der Feuchtekammer inkubiert, zweimal in PBSdef gewaschen und schließlich in 10 µl Fluoromount eingedeckelt. Die Deckgläschen wurden hierfür mit der zell exponierten Seite in den Fluoromounttropfen gelegt und leicht angedrückt. Überschüssiges Fluoromount wurde durch Auflegen eines Papiertuches abgesaugt.

### 4.8.8 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Alle Lösungen wurden in H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub> angesetzt und eiskalt verwendet. Kurz vor Nutzung wurden in CBM, L2 und DB 1 mM PMSF (100 mM-Stammlösung in Isopropanol) und 1:100 PIC (Proteinase-Inhibitor-Cocktail; 7 fach-Stammlösung) zugegeben.

#### **Zell-Puffer Mix (CBM)**

10 mM HEPES-KOH (pH 7,9)  
85 mM KCL  
1 mM EDTA (pH 8,0)

#### **Suspensions-Puffer (L1A)**

90 ml CBM  
1 ml H<sub>2</sub>O<sub>bd</sub>

### **Zellyse-Puffer (L1B)**

9 ml CBM  
1 ml NP-40 (10 %)

### **Kernlyse-Puffer (L2)**

50 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
1 % SDS  
0,5 % CHAPS  
10 mM EDTA (pH8)

### **Dilutions-Puffer (DB)**

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
100 mM NaCl  
2 mM EDTA (pH 8,0)  
0,5 % Triton X-100 (10 %)

### **TE-Puffer**

10 mM Tris-HCl (pH 8,1)  
1 mM EDTA (pH 8)

### **Wasch-Puffer I (WB I)**

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
150 mM NaCl  
0,1 % SDS  
1 % TRITON X-100  
2 mM EDTA (pH 8)

### **Wasch-Puffer II (WB II)**

20 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
500 mM NaCl  
0,1 % SDS  
1 % TRITON X-100  
2 mM EDTA (pH 8)

### **Wasch-Puffer III (WB III)**

10 mM Tris-HCl (pH 7,4)  
250 mM LiCl  
1 % NP-40  
1 % Natriumdeoxycholat  
1 mM EDTA

### **Elutions-Puffer (EB)**

1 % SDS  
100 mM NaHCO<sub>3</sub>

Durch Chromatin-Immopräzipitation (ChIP) mit nachfolgender PCR ist es möglich die direkte oder indirekte *in vivo* Interaktion eines Proteinfaktors an spezifische Genom-Abschnitte zu detektieren. Hierzu werden die Proteine und DNA durch Formaldehyd kreuzvernetzt. Die so fixierten Zellen werden lysiert und die DNA durch Ultraschall zu Stücken mit einer durchschnittlichen Länge von 500 Bp fragmentiert. Chromatin-gebundene Faktoren bleiben weiterhin an den DNA-Abschnitten kreuzvernetzt. Es folgt eine Immunopräzipitation mit Antikörpern gegen den Faktor von Interesse. Bindet dieser Faktor an genomische DNA-



Abschnitte, werden diese ebenfalls präzipitiert und liegen angereichert vor. Die relative Anreicherung von präzipitierten DNA-Abschnitten im Vergleich zu anderen genomischen Abschnitten lässt auf eine Anreicherung des spezifischen Proteinfaktors auf bestimmten Chromatinabschnitten schließen. Für die **Fixierung der sieben Tage kultivierten Makrophagen** wurden 1 % Formaldehyd direkt auf die Zellen in 10 ml Zellkulturmedium gegeben und die Kulturschalen kurz geschwenkt um das Formaldehyd zu verteilen. Zum Stoppen der Kreuzvernetzungsreaktion wurde nach 10 min. 0,125 M Glycin ins Zellmedium gegeben und die Kulturschälchen erneut geschwenkt. Die Zellen wurden dreimal mit eiskaltem PBSdef gewaschen. Danach wurden sie direkt in eiskalten 250 µl L1A/ Kulturschale gekratzt. Die gekratzten Zellen jedes Stimulationsansatzes wurden dann auf Eis vereinigt und resuspendiert. Es wurde dann L1B (eiskalt) hinzugegeben in einem Verhältnis von L1A/L1B von 1/1 und resuspendiert. Die Suspension wurde für 10 min. auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden 20 µl der Zell-Lyse-Suspension abgenommen und hiermit über eine Neubauer-Zählkammer die Konzentration der Zellen bestimmt. Die Zellkerne wurden dann 5 min., bei 700 x g bei 4 °C abzentrifugiert und in 400 µl nukleären Lyspuffer („L2“, eiskalt) /  $10 \times 10^6$  Nuklei resuspendiert. Die Kernlyse konnte für einige Tage bei - 20 °C, oder für längere Zeit bei - 80 °C gelagert werden. Für die **Sonifizierung des Lysats** wurden 600 µl des Zelllysates in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß gegeben. Da der Ultraschall des Sonifikators auch eine Erwärmung des Lysats bedingt, wurde das Gefäß so in die Halterung eingespannt, dass es zum größtmöglichen Anteil in das darunter stehendes Eiswasserbad ragte. Die Spitze des Sonifikators wurde zentriert und so tief wie möglich in das Zelllysate positioniert. Für eine Anreicherung von DNA-Fragmenten mit einer mittleren Länge von 500 Bp wurde das Lysat bei einer Output-Amplitude von 30 %, insgesamt 20 sec. sonifiziert. Dabei wurde eine Sekunde ein Sonifikations-Puls gegeben mit einer anschließenden Pause von 2 sec. Der Zelldebris wurde bei 13000 rpm, 4 °C für 15 min. abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden 9 µl abgenommen. Nach Auflösen der Kreuzvernetzung, sowie RNase- und Proteinase K-Verdau und nachfolgender Aufreinigung der DNA-Fragmente (siehe unten), wurden mit 30 µl des Eluats die Fragmentgröße über ein 1,3 % TAE-Agarosegel überprüft. Vor Beginn der **Immunopräzipitation** wurden pro ChIP 120 µl Protein A-Agarose Beads zusammen in ein Falcongefäß gegeben und der Meniskus markiert. Die Beads wurden dann zweimal in 10 ml TE-Puffer (eiskalt) und einmal 5 ml Blocklösung (eiskalt) gewaschen und jeweils bei 2000 rpm, 4 °C für 5 min. abzentrifugiert. Auf die Waschschrte folgend, wurden die Beads für mindestens zwei Stunden bei 4 °C, in

10 ml Blocklsg. inkubiert (in einem 15 ml-Falcongefäß auf einem Roller). Vom Überstand des sonifizierten Lysats wurden 10 % Input abgenommen (d.h. 9 µl wenn 90 µl Lysat/ ChIP eingesetzt wurden) und bei - 20 °C gelagert. Das Input-Material wurde erst am folgenden Tag weiter verwendet (s.u.). Für jeden ChIP wurden jeweils in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß 90 µl des Lysatüberstandes mit 135 µl DB verdünnt. Die geblockten Beads (s.o.) wurden abzentrifugiert, die überstehende Blocklösung bis zur Markierung des ursprünglichen Meniskus abgenommen und in ein anderes Gefäß umpipettiert (auf Eis). Für die Vorreinigung des verdünnten Lysats wurden jeweils 50 µl der geblockten Beads hinzugegeben und das Lysat bei 4 °C für zwei Stunden rotiert. Auf die restlichen Beads wurde dann wieder die abgenommene Blocklösung gegeben und die Beads bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung rotiert. Die Beads wurden dann für 13000 rpm für 5 min. bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in ein 0,5 ml-Eppendorfgefäß überführt (vorgekühlt). Jeder Immunopräzipitation wurden 4 µg Antikörper bzw. Rabbit IgGs hinzugegeben und dieses dann für 16 Stunden bei 4 °C rotiert. Am nächsten Tag wurde die Blocklösung von den Beads vom Vortag abgenommen, so dass diese wieder in der Original-Verdünnung vorlagen und jeweils 60 µl Beads pro ChIP zugegeben und diese für zwei Stunden bei 4 °C auf einem Roller inkubiert. Folgend wurden die Beads mit 4000 rpm, 5 min. bei 4 °C abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Beads wurden nun in 1 ml TE (eiskalt) aufgenommen und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Die folgenden Waschräume wurden möglichst kalt durchgeführt. D.h. es wurde zügig gearbeitet, alle Waschlösungen waren eiskalt und die Eppendorfgefäße wurden während der Waschräume im 4 °C-Raum auf Eis liegend geschwenkt. Es wurde jeweils zweimal 5 min. in 1 ml TE, zweimal mit WPI, zweimal mit WPII und zweimal mit WPIII gewaschen. Nach jedem Waschräume wurden die Beads mit 3000 rpm, 5 min. bei 4 °C zentrifugiert. Für die **Auflösung der Kreuzvernetzung, RNA-und Protein- Verdau sowie Aufreinigung der ChIPs** wurden die Beads nach dem letzten Waschräume mit 4000 rpm, 5 min. bei 4 °C abzentrifugiert. Die Beads und ebenso das gelagerte Input-Material (s.o.) wurden in 500 µl EB aufgenommen, gevortext und in 0,5 ml-Eppendorfgefäßen für 30 min. rotiert. Die folgenden Reaktionen wurden in einem Thermozykler durchgeführt. Es wurden pro ChIP 20 µl NaCl (5 M), 10 µl EDTA (0,5 M; pH 8), 20 µl TRIS-HCl (1 M; pH 6,8) und 2 µl RNase zugegeben und die für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Danach wurden 3 µl ProteinaseK hinzugegeben und die Ansätze noch einmal vier Stunden bei 37 °C inkubiert bevor sie für 16 Stunden auf 65 °C erhitzt wurden. Am folgenden Tag wurde die Suspension inklusive Beads abgenommen, auf Filtersäulchen (Durapore PVDF 0,45µm von Millipore;

UFC30HV25) geladen und mit 4000 rpm für 5 min. zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in 3 ml PB Qiaquick PCR Purification Kit) gevortext und für 30 min. auf dem Roller inkubiert. Die DNA wurde mit 11000 rpm auf die Qiaquick-Säulchen gebunden. Alle weiteren Zentrifugationsschritte (siehe Qiaquick-Protokoll) wurden bei 13000 rpm durchgeführt. Schließlich wurde die DNA fünf Minuten in 40 µl H<sub>2</sub>O eluiert. Der Elutionsschritt wurde mit demselben Volumen wiederholt.

## 5. Ergebnisse

TAFs besitzen eine essentielle Funktion in der Rekrutierung und Stabilität des PIC und dadurch in der Initiation der Transkription (Thomas and Chiang, 2006). Einer dieser basalen Transkriptionsfaktoren ist TAF4B, ein Paralog des ubiquitären TAF4. TAF4B und TAF4 integrieren durch Domänen des konservierten C-Terminus in den TFIID-Komplex und binden wahrscheinlich direkt an Promotoren (Gazit et al., 2009; Liu et al., 2008). Der N-Terminus von TAF4B unterscheidet sich jedoch von TAF4. Durch diesen Abschnitt interagiert TAF4B mit Aktivatoren wie RelA, c-Jun und OCA-B (Wolstein et al., 2000; Silkov et al., 2002; Geles et al., 2006). Die direkte Bindung von TAF4B an verschiedene Gene wie *a20*, *c-jun* und *integrin  $\alpha 6$*  sowie dessen Funktion als Koaktivator konnte in einigen Zelllinien und *in vitro* aufgezeigt werden (Yamit-hezi et al., 2000; Kalogeropoulou et al., 2010; Geles et al., 2006). Die Notwendigkeit der Transkriptionsregulation durch TAF4B für die Zelldifferenzierung und zelluläre Reaktion auf LPS- sowie TNF- $\alpha$ -Stimuli konnte zudem für B- bzw. T-Lymphozyten und einige weitere Zelltypen aufgezeigt werden (Matza et al., 2001; Silkov et al., 2002; Voronina et al., 2007). Durch TAF4B regulierte Gene wie *a20*, *integrin  $\alpha 6$*  und *tgfb* stellen auch in Monozyten und Makrophagen notwendige Faktoren dar, sowohl in der Zelldifferenzierung als auch für Stimuli-induzierte Reaktionen (Boone et al., 2004; Shi and Simon, 2006; Fairweather and Cihakova, 2010). Als Zellen des angeborenen Immunsystems zeigen Monozyten eine starke Differenzierung zu distinkten Makrophagen-Phänotypen. Diese Differenzierung zu muren Makrophagen ist notwendig für eine potente Reaktionen auf eindringende Pathogene und inflammatorische Signalmoleküle wie TNF- $\alpha$  (Valledor et al., 2006; Geissmann et al., 2010).

In dieser Arbeit soll überprüft werden, ob TAF4B in Zellen des angeborenen Immunsystems, wie Monozyten oder Makrophagen exprimiert wird. Insofern exprimiert, könnte TAF4B durch die Regulation der Transkription essentiell sein für die Differenzierung der Makrophagen. Zudem könnte TAF4B in die Reaktion von Makrophagen auf extrazelluläre Stimuli wie pathogene Muster oder verschiedene Cytokine involviert sein. Möglicherweise ist TAF4B an der Transkription immunologisch relevanter Gene wie *tnf- $\alpha$*  oder *a20* beteiligt.

Aus den erhaltenen Ergebnissen ließen sich weitere Rückschlüsse auf eine Regulation des basalen Transkriptionsfaktors TAF4B ziehen.

## 5.1 TAF4B wird mit Beginn der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen exprimiert

Da es kaum Daten zur Expression basaler Transkriptionsfaktoren in Monozyten oder Makrophagen gab, war es zu Beginn dieser Arbeit das Ziel zu klären, ob das Transkript von *taf4B* und einer postulierten *taf4B*-Splicevariante (Ensembl-Datenbank ENST00000400466; Wu et al., 2005) in Monozyten und Makrophagen durch qRT-PCRs zu detektieren ist. Da TAF4B als Heterodimer zusammen mit TAF4 in den TFIID-Transkriptionskomplex integriert sein kann, wurde ebenfalls versucht das *taf4*-Transkript nachzuweisen (Liu et al., 2008).

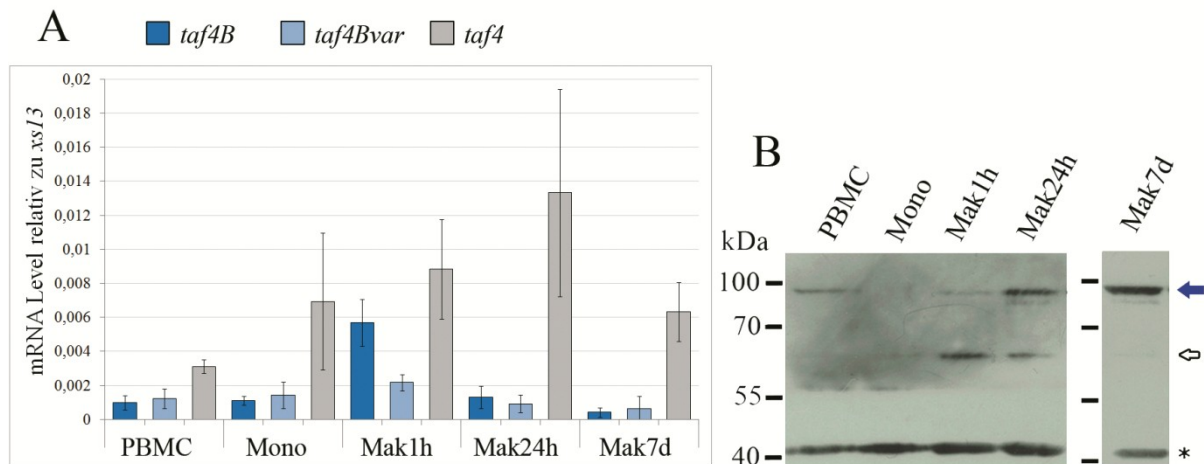
Um zu überprüfen, ob und ab welchem Zeitpunkt *taf4B* in der Makrophagen-Entwicklung exprimiert ist, wurde cDNA aus RNA primärer Monozyten synthetisiert, sowie aus RNA von primären Makrophagen nach einer Stunde, 24 Stunden und sieben Tagen in Kultur. Da das *taf4B*-Transkript in Lymphozyten vorliegt, wurden PBMCs als Positivkontrolle für die Detektion der *taf4B*-mRNA verwendet (Silkov et al., 2002).

Die Durchflusszytometrie-Analyse der elutrierten Monozyten zeigte, dass durch Elutriation eine 83-93 % reine Monozyten-Population isoliert wurde. Allen Versuchen mit adhärenenten Makrophagen gingen zudem Waschschrte mit PBS voraus. Lediglich Makrophagen bleiben trotz PBS-Waschschrten auf der Oberfläche von Kulturschälchen adhärenent. Aus diesem Grund ist es wahrscheinlich, dass in den durchgeführten Versuchen nahezu ausschließlich Makrophagen verwendet wurden.

Das *taf4B*-Transkript, die *taf4B*-Splicevariante sowie die mRNA des ubiquitären *taf4* konnte in der mRNA von PBMCs durch qRT-PCRs detektiert werden (**Abbildung 8 A**). In den elutrierten Monozyten liegen ebenfalls alle drei Transkripte vor. Im Vergleich zu PBMCs ist die mRNA von *taf4* stark erhöht. Im Vergleich zu PBMCs und Monozyten ist die Menge der *taf4B*-mRNA erst mit einsetzender Adhärenz in eine Stunde alten Makrophagen stark erhöht. Mit voranschreitender Entwicklung der Makrophagen nimmt die Menge der *taf4B*-mRNA und der Splicevariante nach 24 Stunden stark ab. Im Gegensatz zum deutlichen Anstieg der *taf4B*-mRNA scheint die *taf4*-mRNA während der Zellentwicklung zu reifen Makrophagen weiterhin konstant vorzuliegen.

Die mRNA von *taf4B* wird in diversen Zelltypen transkribiert, die Translation des Proteins ist vermutlich jedoch strikt reguliert (Wu et al., 2005). Die Expression des TAF4B-Proteins kann darüber hinaus abhängig vom Differenzierungsstadium der Zellen sein (Silkov et al., 2002). Um zu prüfen, in welchem Abschnitt der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen

TAF4B exprimiert wird und an der Transkription beteiligt sein könnte, wurde ein Nachweis des TAF4B-Proteins in Monozyten und Makrophagen durchgeführt. Da Lymphozyten TAF4B exprimieren (Silkov et al., 2002), wurde Proteinextrakt aus PBMCs als Positivkontrolle in den durchgeführten Western-Blots verwendet (**Abbildung 8 B**). Das TAF4B-Protein wurde in PBMCs mit einer distinkten Bande detektiert welche die vorhergesagte molekulare Masse des TAF4B-Proteins aufweist. In elutrierten Monozyten ist



**Abbildung 8. TAF4B wird mit beginnender Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen exprimiert.** (A) Bestimmung der Transkriptmenge von *taf4B*, der *taf4B* Splicevariante (*taf4Bvar*) und *taf4*, in der RNA von PBMCs, Monozyten (Mono), eine Stunde alten Makrophagen (Mak1h), sowie 24 Stunden alten (Mak24h) und sieben Tagen alten Makrophagen (Mak7d). Die Transkriptmenge wurde relativ zur Detektion des *xs13*-Transkriptes bestimmt. Die Daten des gezeigten Diagramms setzen sich zusammen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen ausgewertet zudem wurden die jeweiligen Standardabweichungen berechnet. (B) Western-Blot mit Immundetektion von TAF4B (bei etwa 90 kDa, blauer Pfeil) in Proteinextrakt aus PBMCs, Monozyten (Mono), sowie Makrophagen, welche für eine Stunde (Mak1h), 24 Stunden (Mak24h) und sieben Tage (Mak7d) kultiviert wurden. Der weiße Pfeil markiert eine zusätzliche Bande bei etwa 60 kDa, der Stern markiert Aktin (etwa 40 kDa) als Ladekontrolle. Pro Spur wurden 50 µg Protein aufgetragen.

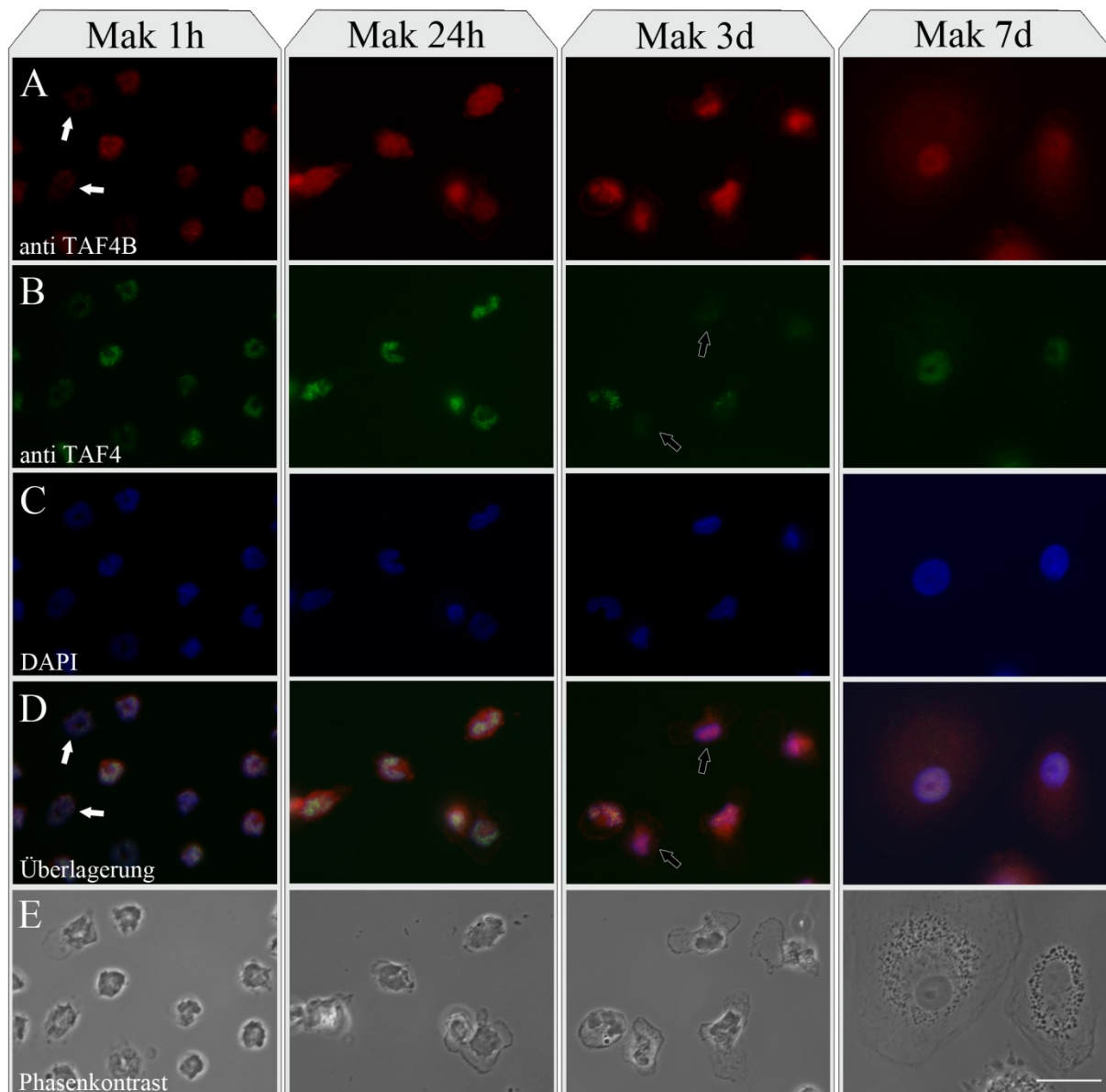
TAF4B hingegen nicht nachweisbar (**Abbildung 8 B**). In adhären, eine Stunde alten Makrophagen konnte eine schwache TAF4B-Bande detektiert werden. Mit voranschreitender Entwicklung der Makrophagen bis zu sieben Tagen nimmt die TAF4B-Menge zu. Zudem wird in Monozyten, eine Stunde und 24 Stunden alten Makrophagen eine weitere Bande bei etwa 60 kDa detektiert, jedoch nicht mehr in sieben Tage alten Makrophagen. Diese zusätzliche Detektion könnte eine mögliche TAF4B-Splicevariante darstellen (Wu et al., 2005). Die Ergebnisse zeigen damit zum ersten Mal die Expression von TAF4B in Immunzellen des angeborenen Immunsystems. Auch hier scheint die Expression des TAF4B-Proteins strikt reguliert zu sein. Zudem deutet die initiale Expression von TAF4B in

adhärenten Makrophagen auf eine differenzierungsabhängige Regulation der TAF4B-Expression hin. Eine Immundetektion des ubiquitären TAF4 in Proteinextrakten aus verschiedenen Zelltypen war durch einen Western-Blot nicht erfolgreich.

## **5.2 Die Kernlokalisierung von TAF4B mit Beginn der Differenzierung von Makrophagen deutet auf eine Funktion in der frühen Zellentwicklung hin**

### **5.2.1 Die nukleäre Lokalisation von TAF4B während der Makrophagen-Differenzierung deutet auf eine transkriptionelle Rolle von TAF4B hin**

Die Aktivität des Transkriptionsfaktors TAF4B wird u.a. durch die spezifische Translokation in das Nukleo- oder Cytoplasma gesteuert (Blackwell and Walker, 2008; O’Dea and Hoffmann, 2010). So ist auch die Lokalisation des TAF4B-Proteins in das Cytoplasma oder den Nukleus in einigen Zellen Stimulus-abhängig (Rashevsky-Finkel et al., 2001). Im Proteinextrakt von Makrophagen wurde TAF4B mit beginnender Adhärenz und Differenzierung detektiert (**Abbildung 8 A**, Seite 46). Damit könnte TAF4B in die Transkription differenzierungsrelevanter Gene involviert sein. Jedoch ist unklar, ob TAF4B konstitutiv im Nukleus der Makrophagen vorliegt oder ähnlich zu Transkriptionsfaktoren der NF $\kappa$ B-Familie erst nach distinkten Stimuli in den Nukleus transloziert (Kearns et al., 2006). Um erste Hinweise in die Funktion von TAF4B zu erhalten, wurde die Lokalisation von TAF4B durch Immunofluoreszenz im Verlauf der Differenzierung der Makrophagen nachgewiesen (**Abbildung 9**, Reihe A). Zudem integriert TAF4B zusammen mit TAF4 in den TFIID-Komplex. Um die erhaltenen Daten tiefergehend interpretieren zu können, wurde deshalb ebenso die Präsenz und Lokalisation des ubiquitären Paraloges TAF4 überprüft (**Abbildung 9**, Reihe B). Um unspezifische Bindungen der verwendeten Antikörper und daraus resultierende Fluoreszenzfärbungen auszuschließen, wurden Kontrollfärbungen ohne primären Antikörper oder mit unspezifischen Kaninchen-IgGs durchgeführt. Diese Kontrollfärbungen wurden grundsätzlich in jedem Immunofluoreszenzansatz durchgeführt. Lediglich Kontrollfärbungen mit Kaninchen-IgGs zeigten eine geringe Hintergrundfärbung.



**Abbildung 9. TAF4B liegt während der Differenzierung von Makrophagen im Zellkern vor.** Ko-Immunofluoreszenz gegen TAF4B (A) und TAF4 (B) mit einer Gegenfärbung der DNA durch DAPI (C). Ebenfalls dargestellt ist ein Überlagerungsbild (D) der TAF4B- und TAF4- Immundetektion und des DAPI-Fluoreszenzsignals. Zur Darstellung des gesamten Zellkörpers wurden zudem Phasenkontrast-Aufnahmen (E) durchgeführt. Die Ko-Immunofluoreszenz wurde an Makrophagen durchgeführt, welche eine Stunde (Mak 1h), 24 Stunden (Mak 24h), drei Tage (Mak 3d) und sieben Tage (Mak 7d) *in vitro* kultiviert wurden. Die weißen Pfeile deuten beispielhaft auf Zellen, welche ein geringes TAF4B-Signal aufwiesen, die schwarzen Pfeile auf Zellen, welche nach drei Tagen kein eindeutiges TAF4-Signal mehr zeigten. Maßstabsbalken = 20 µm.

Die Immunofluoreszenz bestätigte, dass TAF4B in allen eine Stunde bis sieben Tage kultivierten Makrophagen exprimiert wird. Jedoch fanden sich in eine Stunde alten Makrophagen in geringer Anzahl Makrophagen, welche lediglich ein schwaches TAF4B-Signal aufwiesen (Abbildung 9, Mak 1h, Pfeile). Während der betrachteten

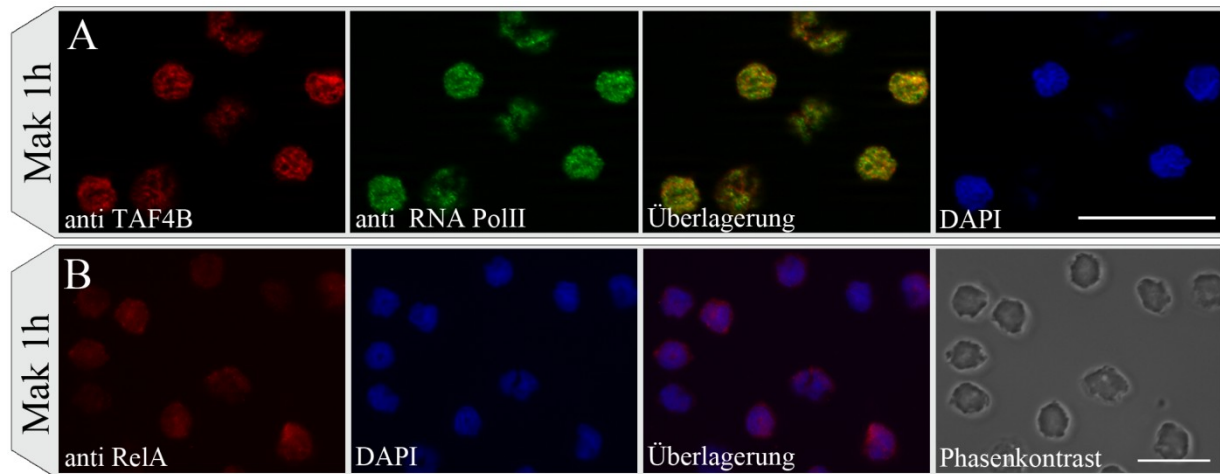


Entwicklungszeitpunkte lokalisiert TAF4B sowohl im Nukleus als auch im Cytoplasma der Makrophagen. Dabei schien TAF4B in eine Stunde alten Makrophagen im Vergleich zu sieben Tage alten Makrophagen stärker im Nukleus angereichert zu sein.

Es war ebenfalls möglich, TAF4 durch Immunofluoreszenz in Makrophagen zu detektieren. TAF4 wurde generell und ausschließlich im Zellkern detektiert. Jedoch fand sich ab einem Zeitpunkt von drei Tagen Kultivierung ein geringer Anteil an Zellen, in welchen TAF4 nicht durch Immunofluoreszenz detektiert werden konnte (**Abbildung 9**, Mak 3d, Pfeile). Es war keine deutliche Zunahme der Anzahl TAF4-negativer Zellen in sieben Tage kultivierten Makrophagen zu beobachten. Eine Kolokalisation des nukleären TAF4B und TAF4 zeigte sich in der Immunofluoreszenz nur partiell. Die Kolokalisation von TAF4B und TAF4 könnte bedeuten, dass TAF4B-Moleküle in Makrophagen teilweise in nukleären TAF4B:TAF4-Heterodimeren vorliegen (Liu et al., 2008).

### **5.2.2 Die Kolokalisation von TAF4B mit aktiver RNA-Polymerase II jedoch nicht mit Fibrillarin, deutet auf eine aktive Funktion von TAF4B in der Transkriptionsregulation während der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung hin**

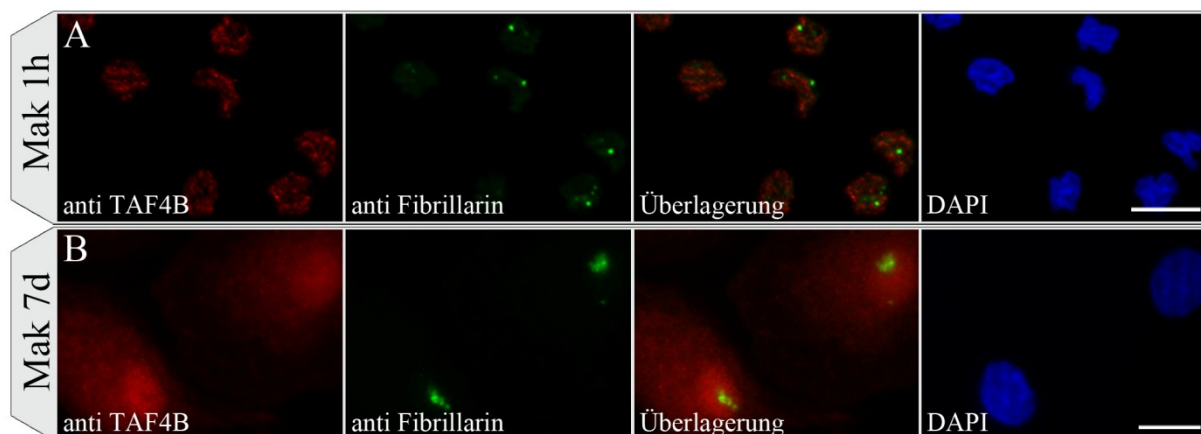
Durch genomweite Transkriptionsprofile wurde aufgezeigt, dass mit einsetzender Adhärenz und der Differenzierung von schwimmenden Monozyten zu adhärenenten Makrophagen das Transkriptionsmuster stark verändert wird (Martinez et al., 2006). TAF4B wird initial mit Beginn der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung exprimiert (**Abbildung 8 B**, Seite 46) und ist zudem im Kern der Makrophagen lokalisiert (**Abbildung 9**, Seite 48). Dies legt eine transkriptionelle Funktion von TAF4B während der frühen Differenzierung der Makrophagen nahe. Um Hinweise darauf zu erhalten, ob TAF4B zu diesem Zeitpunkt in die Transkription involviert ist, wurde TAF4B und die aktive RNA-Polymerase II durch Ko-Immunofluoreszenz in eine Stunde alten Makrophagen detektiert. Die an Serin 5 phosphorylierte C-terminale Domäne (CTD- Ser5PO<sub>4</sub>) der RNA-Pol II stellt das Epitop des Antikörpers dar. Das Serin 5 der CTD wird hauptsächlich während der Transkriptionsinitiation und -Elongation phosphoryliert und wird aus diesem Grund als Marker einer transkriptionell aktiven RNA Pol II angesehen (Egloff and Murphy, 2008). Eine



**Abbildung 10. TAF4B kolokalisiert teilweise mit der aktiven RNA Pol II in eine Stunde alten Makrophagen (Mak1h).** (A) Ko-Immunofluoreszenz mit Immundetektion von TAF4B (anti TAF4B) und aktiver RNA Pol II (anti RNA PolII), sowie die Überlagerung der beiden Fluoreszenzkanäle und die DAPI-Färbung der DNA. (B) Immunofluoreszenz gegen RelA. Hier ist ebenfalls die DAPI-Färbung und die Überlagerung der anti RelA-Detektion und DAPI gezeigt. Zusätzlich ist eine Phasenkontrastaufnahme der Zellen gezeigt. Maßstabsbalken = 20 µm.

Kolokalisation von TAF4B mit CTD-Ser5PO<sub>4</sub> würde darauf hindeuten, dass TAF4B in einen aktiven Transkriptionskomplex integriert ist. In eine Stunde alten Makrophagen kolokalisierte TAF4B zum Teil mit der aktiven RNA-Pol II (**Abbildung 10**, Reihe A). In B-Lymphozyten wird TAF4B jedoch auch durch Stimulation der Zellen mit bakteriellen Oberflächenmolekülen (LPS) im Nukleus angereichert (Rashevsky-Finkel et al., 2001). Die Rezeptorbindung von LPS bedingt ebenfalls eine starke Aktivierung von Makrophagen (Dobrovolskaia and Vogel, 2002). Eine mögliche bakterielle Kontamination während der Aufreinigung oder Kultivierung könnte einen aktivierenden Stimulus auf die Makrophagen ausüben und die nukleäre Lokalisation von TAF4B bedingen. Um auszuschließen, dass sich TAF4B Kontaminationsbedingt im Zellkern der kultivierten Makrophagen befindet, wurde zusätzlich die NFκB-Untereinheit RelA in den eine Stunde kultivierten Makrophagen detektiert (**Abbildung 10 B**). Sollten die Makrophagen durch eine Kontamination aktiviert worden sein, so müsste eine deutliche RelA-Anreicherung im Nukleus der eine Stunde alten Makrophagen zu detektieren sein (Noursadeghi et al., 2008). RelA konnte jedoch in eine Stunde alten Makrophagen nicht eindeutig im Nukleus detektiert werden. Die Kolokalisation von TAF4B und CTD-Ser5PO<sub>4</sub> ist demnach wahrscheinlich nicht durch eine mögliche Kontamination der Makrophagen bedingt. Somit ist dies ein weiterer Hinweis darauf, dass TAF4B zu diesem Zeitpunkt der Monozyten-zu-Makrophagen-Differenzierung in die RNA-Pol II-abhängige Transkription involviert sein könnte.

Neben der direkten Promotorbindung und -Regulation der Transkription sind testisspezifische TAF-Paraloge in *Drosophila melanogaster* durch die Sequestrierung von Polycomb-Proteinen in Nukleolus notwendig für eine ordnungsgemäße Differenzierung von Spermienvorläuferzellen (Chen et al., 2005). Dies könnte einen konservierten Mechanismus darstellen, um ebenfalls in differenzierenden Säugetierzellen indirekt die Transkription zu aktivieren und die Zelldifferenzierung zu bedingen. Diverse Polycomb-Proteine werden auch in primären Makrophagen während der Differenzierung exprimiert (Dembeck, Bachelorarbeit, 2011). Möglicherweise könnte TAF4B durch Sequestrierung und Inhibition der Polycomb-Proteine indirekt die Aktivierung der Transkription und Differenzierung in Makrophagen bedingen. Um zu prüfen, ob TAF4B im Nukleolus angereichert ist, wurde in eine Stunde alten sowie in murenen Makrophagen Ko-Immunofluoreszenz gegen TAF4B und Fibrillarin durchgeführt (**Abbildung 11**). Fibrillarin ist eine Komponente des Nukleolus, welche u.a. an der rRNA-Prozessierung beteiligt ist (Boisvert et al., 2007). Fibrillarin wurde in allen der eine Stunde



**Abbildung 11. TAF4B und Fibrillarin zeigen keine übereinstimmende Lokalisation in eine Stunde oder sieben Tage kultivierten Makrophagen.** Immunofluoreszenz gegen TAF4B (anti TAF4B) und Fibrillarin (anti Fibrillarin) an (A) eine Stunde alten Makrophagen (Mak 1h) und (B) sieben Tage alten Makrophagen (Mak 7d). Zusätzlich wurden beide Immunofluoreszenzen überlagert (Überlagerung) und der Zellkern markiert (DAPI). Maßstabsbalken = 10 µm.

alten Makrophagen gering im gesamten Nukleus verteilt detektiert. Eindeutige Fibrillarin-Akkumulationen waren in den meisten, aber nicht allen eine Stunde alten Makrophagen im Zellkern zu detektieren. Im Gegensatz dazu zeigten die sieben Tage kultivierten Makrophagen grundsätzlich eine deutliche Fibrillarin-Akkumulation im Nukleus. mit der Adhärenz einsetzende Zellvergrößerung und der Verlust der kompakten Monozyten-typischen Kernform (siehe **Abbildung 3**, Seite 15) beeinflussen wahrscheinlich die Form und Lokalisation der Nukleoli sowie des Fibrillarins. Zudem geht mit der beginnenden Makrophagen-

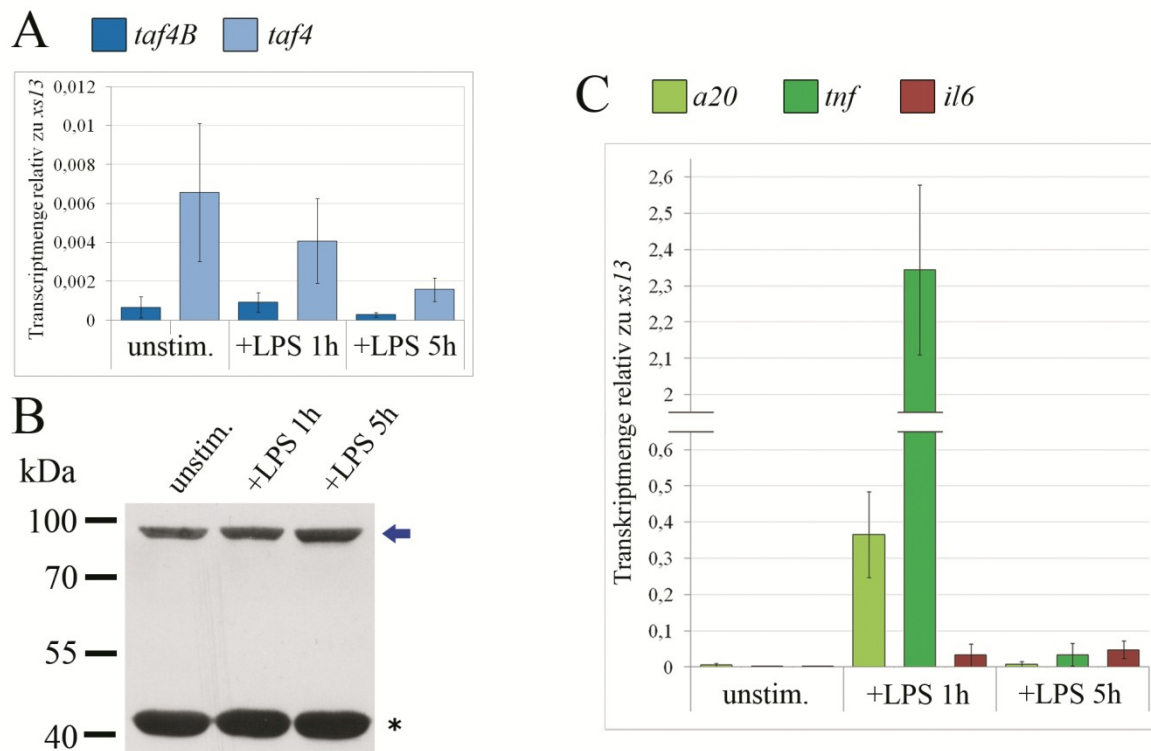
Differenzierung die Neusynthese zahlreicher Proteine einher (Tuomisto et al., 2005). Dies setzt vermutlich die verstärkte Synthese von rRNA und die Ausbildung von Ribosomen voraus, Prozesse in welchen Fibrillarin essentiell ist (Fomproix et al., 1998). Die Fibrillarin-Akkumulation könnten damit eine einsetzende Ribosomenbildung und Proteinsynthese-Aktivität der adhärierenden Zellen widerspiegeln.

### **5.3 TAF4B ist involviert in die proinflammatorische Reaktion von reifen Makrophagen**

#### **5.3.1 Die LPS-Aktivierung von Makrophagen bedingt eine verstärkte Expression von TAF4B und induziert die Transkription der möglichen TAF4B-Zielgene *a20* und *tnf- $\alpha$***

In den Körper eindringende Pathogene werden initial durch Makrophagen und weitere Immunzellen erkannt. Durch die Erkennung der Pathogene werden Makrophagen proinflammatorisch aktiviert und verschiedene Reaktionen zur Pathogenabwehr exprimiert (Rasmussen et al., 2009). Die LPS-Stimulation bedingt in B-Lymphozyten eine verstärkte TAF4B-Expression und -Anreicherung im Zellkern (Freiman et al., 2002). Da TAF4B in primären reifen Makrophagen exprimiert wird (**Abbildung 8 B**, Seite 46), könnte TAF4B ebenfalls in Makrophagen in die Reaktion auf LPS involviert sein. Die LPS-Stimulation der Makrophagen bedingt u.a. die Aktivierung der NF $\kappa$ B-Untereinheiten RelA und cRel. Abhängig von Stärke und Dauer des Stimulus induzieren RelA und cRel spezifische Transkriptionsmuster und so u.a. die Transkription der putativen TAF4B-Zielgene *a20* und *tnf- $\alpha$*  (O'Dea and Hoffmann, 2010).

Um erste Hinweise auf eine Funktion von TAF4B in der Reaktion auf bakterielle Lipopolysaccharide zu erhalten, wurde zunächst überprüft, ob die LPS-Aktivierung von reifen Makrophagen die Transkription von *taf4B* oder *taf4* beeinflusst. Sieben Tage alte Makrophagen wurden hierfür unstimuliert verwendet oder für eine Stunde bzw. fünf Stunden mit LPS stimuliert. Die Transkriptmenge von *taf4B* und *taf4* wurde durch qRT-PCRs detektiert (**Abbildung 12 A**). Die LPS-Stimulation der Makrophagen bedingte eine geringe Zunahme der *taf4B*-mRNA nach einstündiger Stimulationsdauer. Folgend sank die Menge des



**Abbildung 12. Die Aktivierung der reifen Makrophagen mit Lipopolysacchariden induziert eine verstärkte TAF4B-Expression sowie die Transkription der möglichen TAF4B-Zielgene *a20* und *tnf- $\alpha$* .** **A)** Detektion der Transkriptmengen von *taf4B* und *taf4* durch qRT-PCR aus cDNA von unstimulierten (unstim.), eine Stunde (+LPS 1h) und fünf Stunden (+LPS 5h) LPS-stimulierten, reifen Makrophagen. Die detektierten Transkriptmengen wurden gegen das *xs13*-Transkript kalkuliert. **B)** Immundetektion von TAF4B (Blauer Pfeil) in Proteinextrakt aus unstimulierten Makrophagen sowie Makrophagen welche eine Stunde oder fünf Stunden mit LPS stimuliert wurden. Als Ladekontrolle wurde Aktin detektiert (Sternchen). Pro Spur wurden 50  $\mu$ g Protein auf den Western-Blot geladen. **C)** Transkriptmengen von *a20*, *tnf- $\alpha$* , *il6* in der cDNA von unstimulierten, eine Stunde und fünf Stunden LPS-stimulierten Makrophagen. Die Daten der Diagramme wurden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet und die jeweiligen Standardabweichungen berechnet.

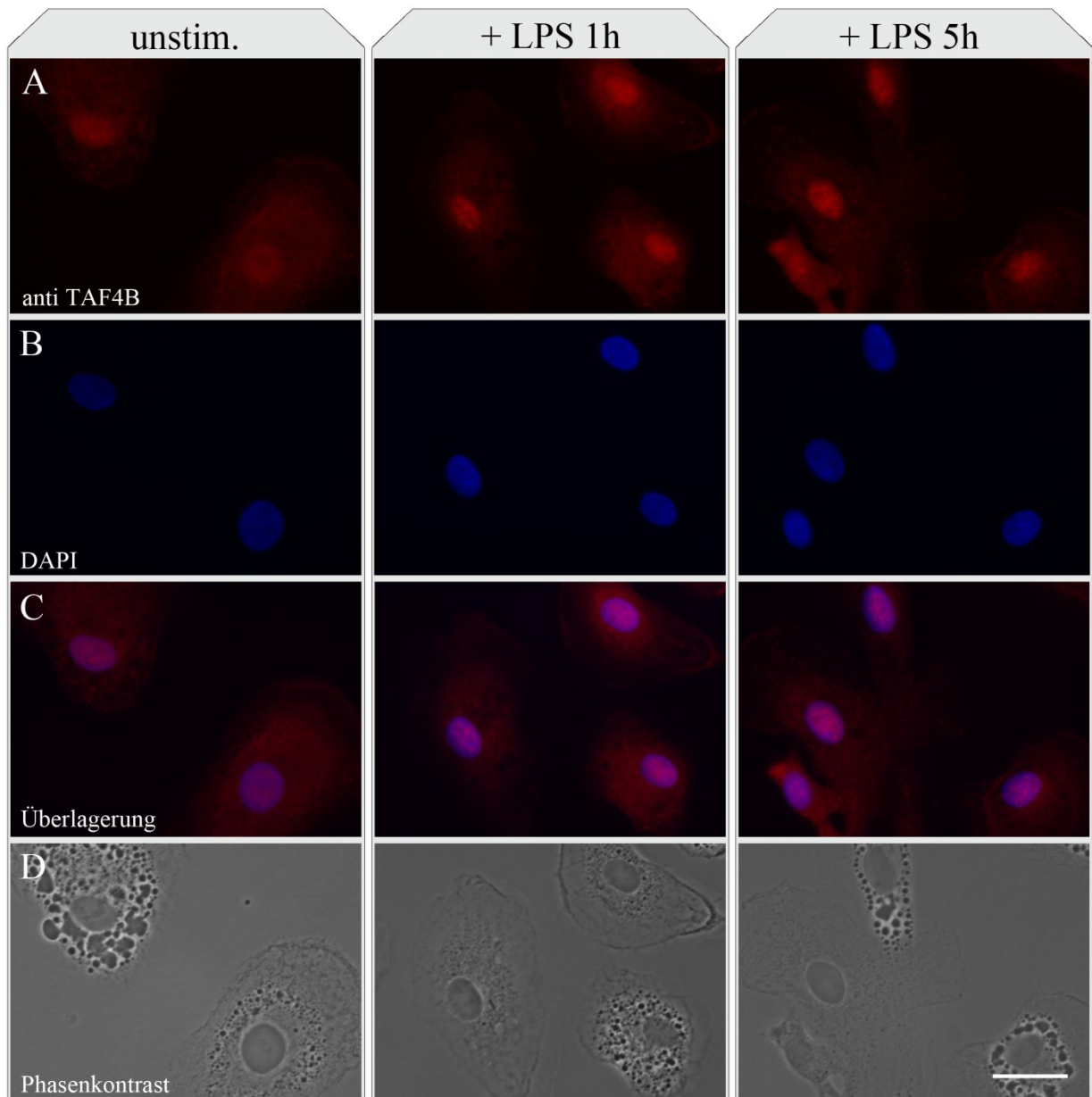
*tafB*-Transkripts nach fünf Stunden LPS-Stimulation wieder gering ab. Die Transkriptmenge von *taf4* nahm im Vergleich zu unstimulierten Makrophagen mit fortdauernder LPS-Stimulation bis zu fünf Stunden ab. Während der Effekt der Stimulation auf das *taf4B*-Transkript nur gering scheint, liegt *taf4* deutlich reduziert vor. Da die TAF4B-Expression vermutlich stark auf posttranskriptioneller Ebene reguliert ist (Dikstein et al., 1996), wurde außerdem die Proteinmenge von TAF4B nach LPS-Stimulation der Makrophagen überprüft. Hierfür wurde parallel Proteinextrakt aus ruhenden Makrophagen sowie aus Makrophagen, welche für eine Stunde oder für fünf Stunden mit LPS stimuliert wurden, verwendet (siehe **Abbildung 12 B**). Die LPS-Stimulation der Zellen führte zu einem geringen Anstieg der TAF4B-Menge nach einer Stunde und zu einer weiteren Zunahme des TAF4B-Proteins nach fünfstündiger LPS-Stimulation.

Das *a20*-Gen wird in unstimulierten Makrophagen konstitutiv in sehr geringen Mengen transkribiert (Park et al., 2011; Liang et al., 2012). Die Stimulation der Zellen durch LPS induziert dann nach kurzer Zeit die Transkription der *a20* und *tnf- $\alpha$* , sowie nach verlängerter Stimulation die Transkription von *il6* (**Abbildung 5**, Seite 20; Lee and Sullivan, 2001; Wollenberg et al., 1993; Liang et al., 2012; Westra et al., 2004). Zum Eingrenzen des Zeitraums innerhalb der LPS-Stimulation, in welchem TAF4B an der Transkription der putativen Zielgene *a20* und *tnf- $\alpha$*  in den kultivierten Makrophagen beteiligt sein könnte, wurden die Transkripte von *a20* und *tnf- $\alpha$*  nach LPS-Stimulation der Makrophagen durch qRT-PCRs detektiert. Zusätzlich wurde das *il6*-Transkript als Stimulationskontrolle verwendet, da *il6* erst in stimulierten Makrophagen transkribiert wird und in unstimulierten Makrophagen nicht vorliegen sollte (Hall et al., 1991; Becker et al., 1991). Die *a20*-mRNA lag in unstimulierten Makrophagen nur in sehr geringen Mengen vor (**Abbildung 12 C**). Die mRNA von *tnf- $\alpha$*  und *il6* waren in unstimulierten Zellen nahezu nicht zu detektieren. Die LPS-Stimulation der Makrophagen für eine Stunde führte zu einer stark erhöhten Transkription sowohl von *a20* als auch von *tnf- $\alpha$* . Auch *il6* wird nach einstündiger LPS-Stimulation transkribiert, jedoch in geringerer Menge. Mit anhaltender LPS-Stimulation nach fünf Stunden sinkt die *a20*-Menge wieder auf das ursprüngliche Maß der unstimulierten Zellen. Das Signal der *tnf- $\alpha$* -Detektion ist hier zwar ebenfalls stark vermindert, ist jedoch noch deutlich vorhanden. Die Menge der *il6*-mRNA war in den fünf Stunden stimulierten Makrophagen weiter angestiegen im Vergleich zu den eine Stunde LPS-stimulierten Makrophagen. Diese Daten zeigen, dass im Zeitraum einer einstündigen LPS-Stimulation eine wesentlich stärkere Transkription von *a20* und *tnf- $\alpha$*  stattfindet im Vergleich zur fünfstündigen Stimulation. Damit bestätigen die erhaltenen qRT-PCR-Daten die bekannten Transkriptionsmuster von *a20*, *tnf- $\alpha$*  und *il6* in LPS-stimulierten Makrophagen. Das proinflammatorische Cytokin *il6* wurde in unstimulierten Makrophagen nicht transkribiert. Dies belegt, dass die verwendeten Makrophagen nicht durch eine Kontamination der Zellkultur vorstimuliert wurden, sondern wahrscheinlich in einem ruhenden Zustand vorlagen. Die erhöhte Proteinmenge von TAF4B könnte darauf hindeuten, dass TAF4B in die proinflammatorische Reaktion von Makrophagen involviert ist. Sollte TAF4B an der Transkription von *a20* und *tnf- $\alpha$*  in Makrophagen beteiligt sein, dann wahrscheinlich innerhalb einer einstündigen LPS-Stimulation der Makrophagen.

### 5.3.2 Die Stimulation von Makrophagen mit bakteriellen Lipopolysacchariden induziert die nukleäre Anreicherung von TAF4B, RelA und cRel

Die Stimulation von B-Lymphozyten mit LPS führt zu einer Translokation von TAF4B in den Nukleus der Zellen (Rashevsky-Finkel et al., 2001). Zudem wurde eine Funktion von TAF4B in der Transkriptionsregulation von HEK-Zellen nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  gezeigt (Yamit-hezi et al., 2000). In reifen Makrophagen induziert die LPS-Stimulation eine Zunahme des TAF4B-Proteins (**Abbildung 12 A**, Seite 53). Zusammen mit vorangegangenen Daten könnte dies auf eine Funktion von TAF4B in der proinflammatorischen Reaktion von primären Makrophagen auf die bakteriellen Oberflächenmoleküle hindeuten. Die erhöhte Transkription von *a20* und *tnf- $\alpha$*  machen es möglich, dass nukleäres TAF4B die LPS-aktivierte Transkription der beiden Gene reguliert. Da sowohl *a20* als auch *tnf- $\alpha$*  durch einen Kurzzeitstimulus aktiviert werden (**Abbildung 12 C**, Seite 53), müsste TAF4B nach einstündiger LPS-Stimulation im Nukleus der Makrophagen angereichert sein. Um die Lokalisation von TAF4B nach LPS-Stimulation zu bestimmen, wurde Immunofluoreszenz gegen TAF4B an reifen Makrophagen durchgeführt (**Abbildung 13**).

Die Immunofluoreszenz zeigt, dass TAF4B in unstimulierten Makrophagen hauptsächlich im Cytoplasma und in geringer Menge im Nukleus vorliegt. Wurden die Zellen für eine Stunde mit LPS stimuliert, nahm die nukleäre TAF4B-Menge zu. Dabei liegt TAF4B im kompletten Nukleus verteilt vor und scheint in bestimmten Bereichen gering zu akkumulieren. Die Stimulation der Makrophagen für fünf Stunden führte zu keiner weiteren Zunahme der nukleären TAF4B-Menge. Vergleichbar zur nukleären Lokalisation in einstündig stimulierten Makrophagen schien der fünfstündige LPS-Stimulus hier ebenfalls eine distinktere Lokalisation von TAF4B im Zellkern zu induzieren. Die im Western-Blot detektierte Zunahme des TAF4B-Proteins nach LPS-Stimulation (**Abbildung 12 A**, Seite 53) war in der Immunofluoreszenz jedoch nicht eindeutig zu erkennen. Da TAF4B nach einer Stunde zum Zeitpunkt der LPS-induzierten Transkription von *a20* und *tnf- $\alpha$*  im Nukleus der aktivierten Makrophagen vorliegt, könnte es demnach an der Transkription der beiden Gene beteiligt sein. Sowohl RelA als auch cRel interagieren *in vitro* mit TAF4B. Ektopisch exprimiertes TAF4B reguliert zudem in Interaktion mit NF $\kappa$ B-RelA die Genexpression in TNF- $\alpha$ -stimulierten HEK-Zellen (Yamit-hezi et al., 2000). Ausgehend von der Annahme, dass TAF4B auch in Makrophagen mit RelA oder cRel interagiert, wurde folgend der Zeitpunkt

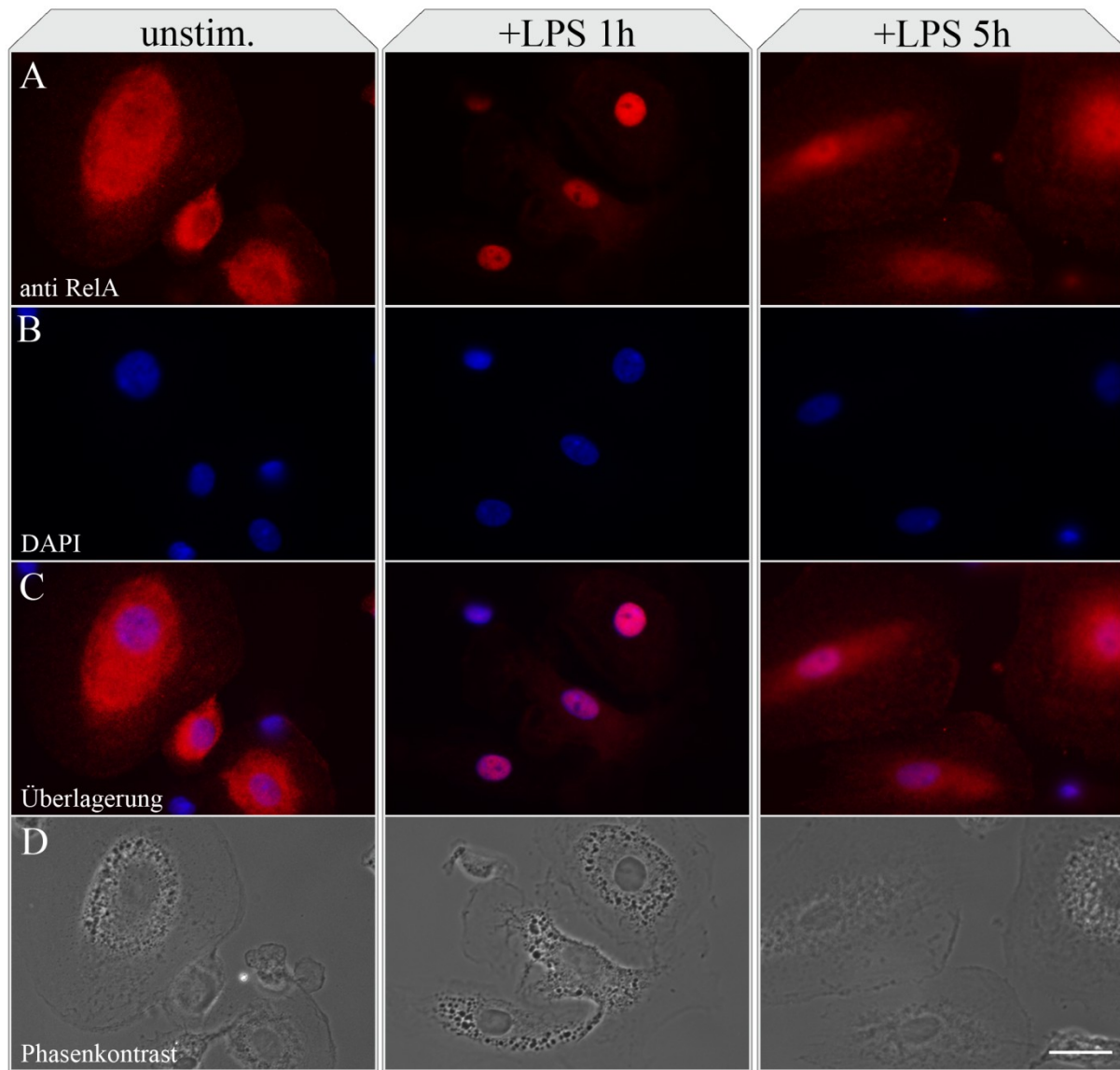


**Abbildung 13. Stimulation von reifen Makrophagen mit LPS für eine und fünf Stunden bedingt eine nukleäre Anreicherung von TAF4B.** Reihe (A) Immunofluoreszenz gegen TAF4B, (B) DAPI-Färbung der DNA, (C) Überlagerung der anti TAF4B und-DAPI-Färbung, (D) Phasenkontrastaufnahme. Maßstabsbalken= 20  $\mu$ m.

ermittelt, zu RelA oder cRel nach einem LPS-Stimulus ebenfalls im Nukleus vorliegen, um hier möglicherweise mit TAF4B zu interagieren. Aufgrund der starken Transkription der NF $\kappa$ B-Zielgene *a20* und *tnf- $\alpha$*  nach LPS-Stimulation (Abbildung 12 C, Seite 53 ) ist es anzunehmen, dass ebenfalls RelA und vermutlich cRel im Nukleus vorliegen, um die Transkription der beiden Gene zu induzieren. Um zu überprüfen, ob eine einstündige LPS-Aktivierung zur Translokation von RelA oder cRel in den Nukleus führt und damit eine Interaktion mit nukleären TAF4B möglich machen könnte, wurden in stimulierten

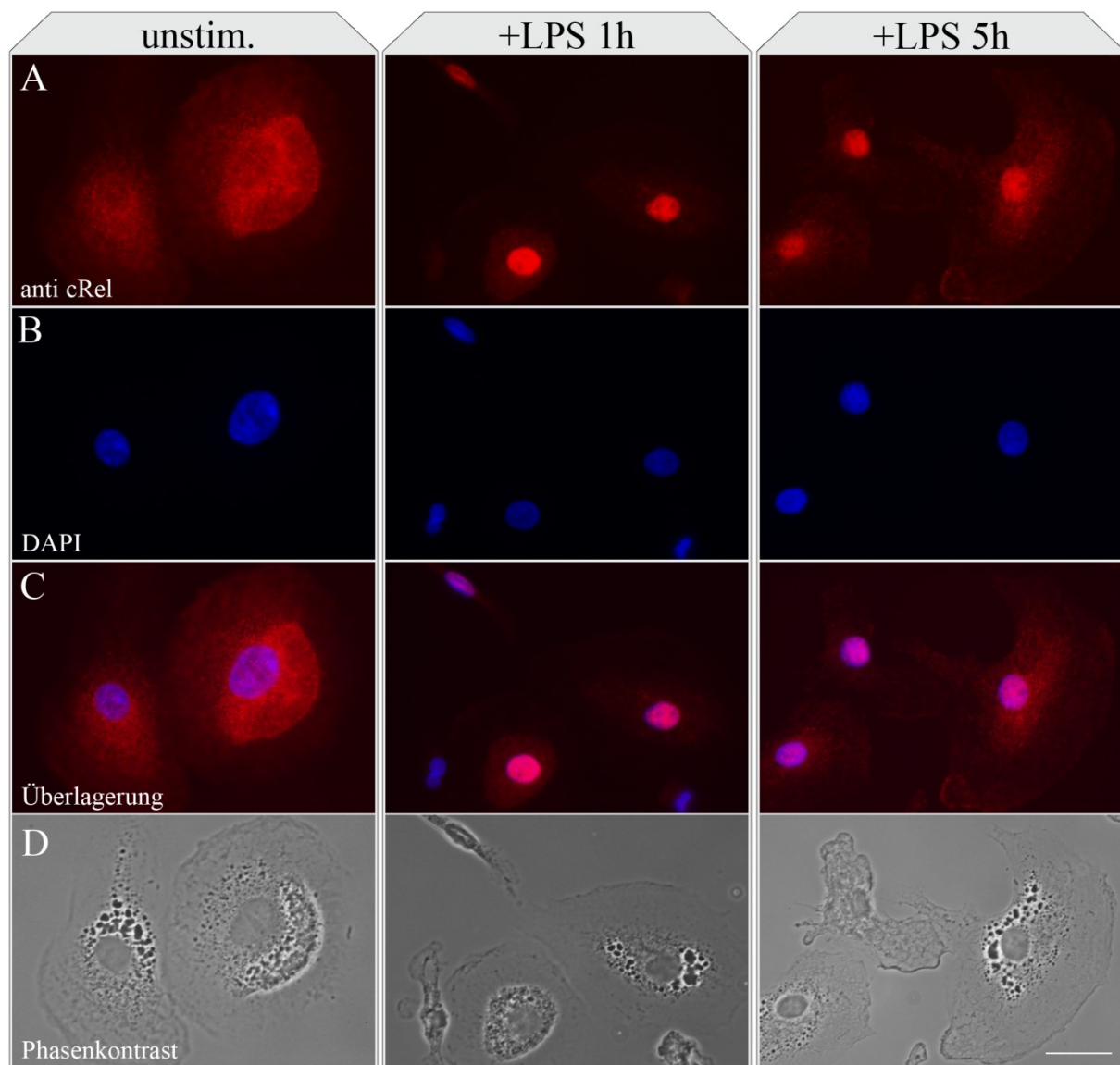


Makrophagen Immunofluoreszenzfärbungen gegen RelA (**Abbildung 14**) und cRel (**Abbildung 15**) vorgenommen. RelA wurde in unstimulierten Makrophagen kaum im Nukleus detektiert, sondern liegt hier hauptsächlich im Cytoplasma vor. Eine Stunde nach LPS-Aktivierung der reifen Makrophagen ist RelA hingegen im Nukleus lokalisiert. Die verlängerte Stimulation für fünf Stunden führte zu einer deutlichen Relokalisation von RelA in das Cytoplasma der Makrophagen.



**Abbildung 14. RelA liegt nach einstündiger LPS-Aktivierung der Makrophagen hauptsächlich im Nukleus vor.** Immunofluoreszenz an sieben Tage alten Makrophagen, unstimuliert (unstim.), LPS-stimuliert für eine Stunde (+LPS 1h) und LPS-stimuliert für fünf Stunden (+LPS 5h). Reihe (A) Immunofluoreszenz gegen RelA, mit DAPI-Färbung der DNA in Reihe (B). Reihe (C) Überlagerung der RelA-Immundefektion mit der DAPI-Färbung, Reihe (D) Phasenkontrastaufnahmen. Maßstabsbalken = 20 µm.

Durch die Immunfluoreszenz gegen den möglichen TAF4B-Interaktionspartner cRel, wurde dieser in unstimulierten Makrophagen nicht eindeutig im Nukleus detektiert (**Abbildung 15**). Die einstündige LPS-Stimulation der reifen Makrophagen induzierte demgegenüber eine starke Translokation von cRel in den Nukleus. Nach fünf Stunden LPS-Stimulation war cRel vergleichbar zu RelA wieder verstärkt im Cytoplasma relocalisiert, wurde aber auch hier noch deutlich im Nukleus detektiert. Damit bestätigt die Immunofluoreszenz, dass cRel nach LPS-Stimulation zeitlich vergleichbar zu RelA in den Nukleus lokalisiert, wodurch wahrscheinlich



**Abbildung 15.** Die LPS-Stimulation primärer Makrophagen bedingt eine starke cRel Anreicherung in den Nukleus nach einer Stunde. Immunofluoreszenz an sieben Tage alten Makrophagen welche unstimuliert vorlagen (unstim.), LPS-stimuliert für eine Stunde (+LPS 1h) und für fünf Stunden LPS-stimuliert (+LPS 5h). Reihe (A) Immunofluoreszenz gegen cRel, Reihe (B) DAPI-Färbung der DNA, Reihe (C) Überlagerung von cRel-Immunodetektion und DAPI-Färbung, Reihe (D) Phasenkontrast-Aufnahmen. Maßstabsbalken = 20 µm.

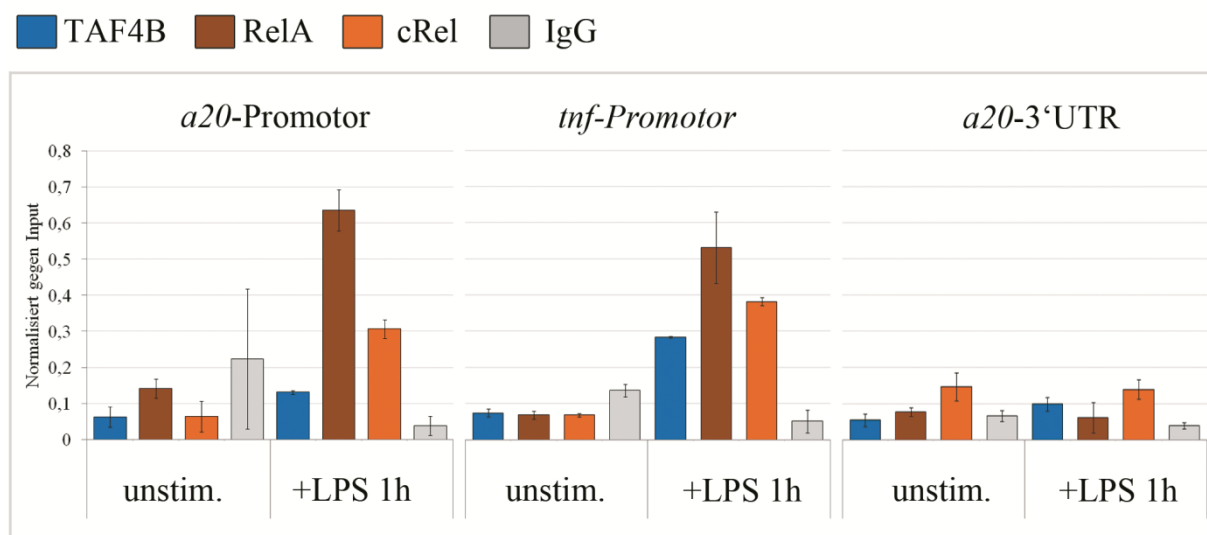
die Bildung von RelA:cRel-Dimeren (O’Dea and Hoffmann, 2010) in Makrophagen reflektiert wird.

Die induzierte Translokation der NFκB-Aktivatoren RelA und cRel bestätigt ergänzend zur LPS-induzierten Transkription von *a20* und *tnf-α* (**Abbildung 12 C**, Seite 53) die erfolgreiche LPS-Aktivierung der Makrophagen (Conti et al., 1997; Ghosh et al., 1998). Die gemeinsame Lokalisation von TAF4B, RelA und cRel im Nukleus der Makrophagen nach einer Stunde LPS-Stimulation macht damit eine gemeinsame Transkriptionsregulation der aktivierten, putativen Zielgene *a20* und *tnf-α* durch TAF4B in Kooperation mit RelA beziehungsweise cRel möglich.

### 5.3.3 Die LPS-Stimulation induziert die Bindung von TAF4B an den Promotor von *tumor necrosis factor alpha* zusammen mit RelA und cRel

Nach proinflammatorischer Stimulation binden TAF4B und NFκB-RelA in Jurkat-Zellen an den Promotor des antiapoptotischen Gens *a20* und aktivieren dessen Transkription (Ainbinder et al., 2002). Unter anderem in Makrophagen binden RelA-Proteine dabei nach Aktivierung an bekannte NFκB-Bindesequenzen der Promotorregionen von *a20* und *tnf-α* (Übersichtsartikel: Verstrepen et al., 2010; Übersichtsartikel: Falvo et al., 2010). Ebenfalls ist in Makrophagen die Bindung des *tnf-α*-Promotors durch cRel bekannt, während eine Bindung des *a20*-Promotors durch cRel dagegen nicht dokumentiert ist (Falvo et al., 2010). Sowohl die Transkription der putativen TAF4B-Zielgene *a20* und *tnf-α* (**Abbildung 12 C**, Seite 53) als auch die nukleäre Anreicherung von TAF4B, RelA und cRel wird nach einstündiger LPS-Stimulation in Makrophagen induziert (**Abbildung 13**, Seite 56). Um die mögliche Bindung von TAF4B, RelA und cRel an die Promotoren von *a20* und *tnf-α* in primären Makrophagen zu überprüfen, wurden Chromatin-Immunpräzipitationen (ChIPs) durchgeführt. Da *a20* und *tnf-α* nach einer Stunde LPS-Stimulation in Makrophagen transkribiert wurden (**Abbildung 12**, Seite 53), wurde das ChIP-Protokoll an eine Stunde LPS-stimulierten Makrophagen durchgeführt. Die verwendeten Primer gegen die Promotoren des *a20*-oder *tnf-α*-Gens amplifizierten jeweils Abschnitte, welche bekannte NFκB-Bindesequenzen umfassen. Da TAF4B sowie RelA und cRel Transkriptionsfaktoren darstellen,

welche an der Initiation der Transkription beteiligt sind, sollte keiner der drei Faktoren an der 3'-UTR des *a20*-Gens lokalisiert sein. Die 3'-UTR des *a20*-Gens wurde aus diesem Grund als Negativkontrolle verwendet, um zu belegen, dass DNA-Fragmente nicht unspezifisch durch das ChIP-Protokoll präzipitiert wurden und dadurch falsch-positive Detektionen in der folgenden qRT-PCR entstanden. Parallel zu spezifischen Antikörpern gegen TAF4B, RelA und cRel wurden statt eines spezifischen Antikörpers als Negativ-Kontrolle der Immunpräzipitation Kaninchen IgGs eingesetzt. So sollte gezeigt werden, inwieweit Proteine unspezifisch durch das ChIP-Protokoll gebunden werden und Hintergrund-Detektionen in den qRT-PCRs aufgezeigt werden. Die Auswertungen der durchgeführten ChIPs durch qRT-PCRs sind in **Abbildung 16** dargestellt. Der *a20*-Promotor ist in unstimulierten Makrophagen durch



**Abbildung 16. TAF4B bindet nach LPS-Aktivierung der primären Makrophagen an den Promotor von *tnf- $\alpha$* .** Auswertung der durchgeführten ChIP-Versuche durch qRT-PCR. Verwendet wurde ChIP-Material von Immunopräzipitation RelA, cRel, TAF4B und Kaninchen-IgGs (IP-Kontrolle) an die Promotoren der LPS-induzierten Gene *a20*, *tnf- $\alpha$*  und an die 3'-untranslatierte Region des *a20*-Gens. Die verwendeten Makrophagen wurden ruhend verwendet (unstim.) oder nach einer Stunde LPS-Stimulation (+LPS 1h). Für die Auswertung der durchgeführten qRT-PCRs wurde  $\Delta$ Ct der Amplifikation der spezifischen Immunopräzipitation im Bezug zu Eingangsmaterial (1:10 verdünnt) berechnet. Die Diagrammdaten und die jeweiligen Standardabweichungen wurden aus mindestens drei unabhängigen Versuchen berechnet.

keinen der drei Transkriptionsfaktoren gebunden. Nach der LPS-Aktivierung der Makrophagen konnte eine eindeutige Bindung des *a20*-Promotors durch RelA und cRel, jedoch nicht durch TAF4B detektiert werden. In unstimulierten Makrophagen zeigte der *tnf- $\alpha$* -Promotor wie zu erwarten ebenfalls keine Bindung durch TAF4B, RelA und cRel. Nach Stimulation der Makrophagen zeigte sich jedoch eine eindeutige Bindung von TAF4B an den

Promotor von *tnf- $\alpha$* , sowie ebenfalls durch RelA und cRel. Das *a20-3'*UTR zeigte demgegenüber keinerlei Anreicherung der drei Transkriptionsfaktoren in un-stimulierten und stimulierten Makrophagen.

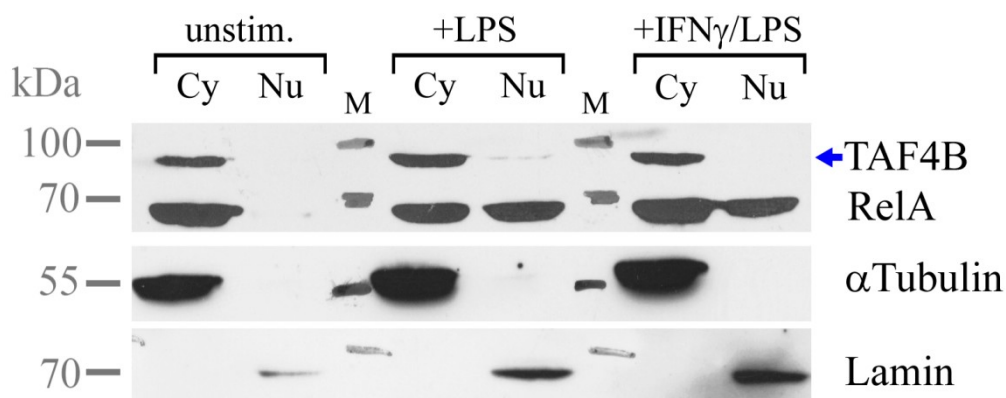
Die ChIP Experimente zeigen damit erstmals eine LPS-induzierte Bindung von TAF4B an den Promotor von *tnf- $\alpha$*  in primären Makrophagen. Weiter belegt die LPS-induzierte Bindung von RelA und cRel die bekannte Bindung von RelA und cRel an den *tnf- $\alpha$*  Promotor in primären Makrophagen (Verstrepen et al., 2010; Falvo et al., 2010). Zudem konnte hier erstmals gezeigt werden, dass cRel in primären Makrophagen an den Promotor des *a20*-Gens bindet. Die LPS-induzierte Bindung von TAF4B an *tnf- $\alpha$*  in Interaktion mit NF $\kappa$ B-Untereinheiten zeigt damit, dass TAF4B wahrscheinlich an der proinflammatorischen Reaktion von Makrophagen beteiligt ist. Dies steht in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten, welche auf eine Funktion von TAF4B in der Regulation proinflammatorischer Stimuli hindeuten (Yamit-hezi et al., 2000; Rashevsky-Finkel et al., 2001).

### **5.4 Die proinflammatorische Interferon $\gamma$ -Vorstimulierung von Makrophagen inhibiert die LPS-induzierte Anreicherung von TAF4B im Zellkern**

Abhängig von der Art und Schwere der Entzündungsreaktion sezernieren T-Lymphozyten am Entzündungsort das Cytokin IFN $\gamma$ . IFN $\gamma$  wird durch Makrophagen erkannt, was hier zu einer Signalkaskade und proinflammatorischen Vorstimulierung führt. Diese IFN $\gamma$ -Vorstimulation führt in Makrophagen nach LPS-Aktivierung unter anderem zu einer Modulierung und Verstärkung der Transkription verschiedener NF $\kappa$ B-Zielgene wie *tnf- $\alpha$* . Wodurch der IFN $\gamma$ -Stimulus die Transkription von *tnf- $\alpha$*  moduliert, ist jedoch nicht vollständig geklärt (Collart et al., 1986; Lee and Sullivan, 2001; Hayes and Zoon, 1993).

TAF4B wird nach LPS-Aktivierung der maturen Makrophagen im Nukleus angereichert (**Abbildung 13**, Seite 56). Möglicherweise könnte es als Koaktivator die IFN $\gamma$ -vermittelte Verstärkung der Transkription LPS-induzierter Gene regulieren. Aus diesem Grund wäre es möglich, dass TAF4B nach einer IFN $\gamma$ -Behandlung und folgender LPS-Aktivierung der Makrophagen verstärkt in den Nukleus transloziert. Um dies näher zu beleuchten, wurden sieben Tage alte Makrophagen für weitere drei Tage mit IFN $\gamma$  vorstimuliert und folgend für

eine Stunde mit LPS aktiviert. Als Kontrollen wurden zehn Tage alte Zellen unstimuliert verwendet oder für eine Stunde mit LPS stimuliert. Das Zellplasma wurde dann in Cytoplasma und Nukleoplasma fraktioniert, auf einen Western-Blot aufgetragen und eine Immundetektion gegen TAF4B durchgeführt (**Abbildung 17**). Um die Aktivierung der Makrophagen durch LPS oder IFN $\gamma$ /LPS zu kontrollieren, wurden zudem Immundetektionen gegen RelA durchgeführt. Als Kontrollen für eine funktionierende Fraktionierung des Zellplasmas wurde zudem  $\alpha$ -Tubulin als Cytoplasma-Marker und Lamin als Nukleoplasma-Marker eingesetzt. In unstimulierten Makrophagen konnte kein nukleäres TAF4B nachgewiesen werden. Ebenso wurde RelA ausschließlich im Cytoplasma der unstimulierten Makrophagen detektiert. Nach LPS-Stimulation scheint der Hauptanteil des TAF4B-Proteins



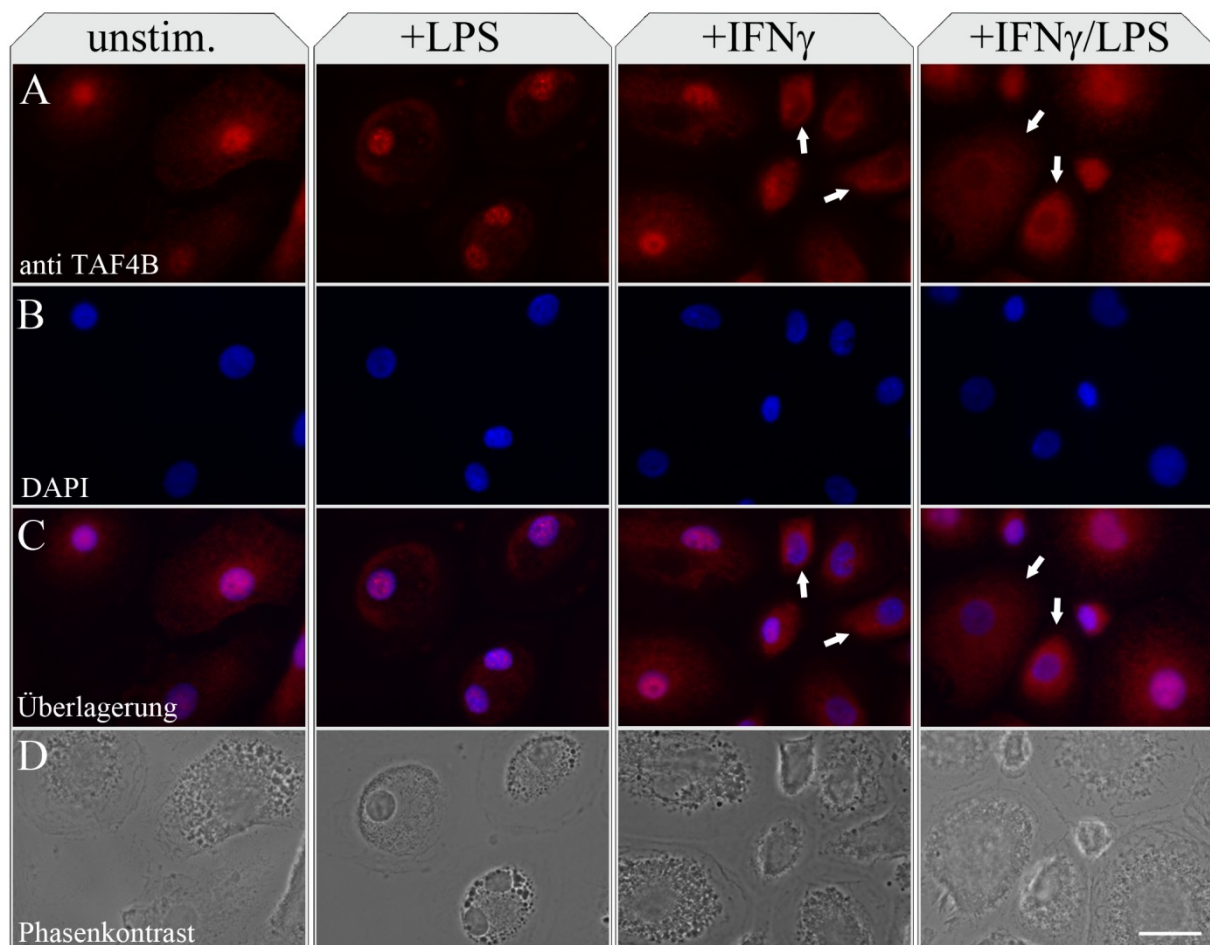
**Abbildung 17. Die IFN $\gamma$ -Vorstimulierung von reifen Makrophagen verhindert die LPS-induzierte TAF4B-Translokation in den Nukleus.** Western-Blot mit Antikörperdetektion von TAF4B, RelA,  $\alpha$ Tubulin und Lamin (angegeben rechts neben Blot). Das Cytoplasma (Cy) und Nukleoplasma (Nu) wurden fraktioniert aus zehn Tage alten Makrophagen, welche unstimuliert vorlagen (unstim.), für eine Stunde mit LPS stimuliert wurden (+LPS) oder für 72 Stunden mit Interferon $\gamma$  vorstimuliert und anschließend für eine Stunde mit LPS aktiviert wurden (+IFN $\gamma$ /LPS). Die  $\alpha$ Tubulin-Detektion wurde als Cytoplasma-Marker, die Lamin-Detektion als Nukleoplasma-Marker verwendet.

weiterhin im Cytoplasma zu lokalisieren. Jedoch führte die Stimulation zu einer geringen TAF4B-Anreicherung im Nukleoplasma. Nach Vorstimulierung der Makrophagen mit IFN $\gamma$  wurde TAF4B trotz der nachfolgenden LPS-Stimulation ausschließlich im Cytoplasma der Zellen detektiert, im Nukleoplasma lag TAF4B nach IFN $\gamma$ -Vorstimulation und LPS-Stimulation nicht vor. Demgegenüber bedingte sowohl die LPS-Stimulation als auch die kombinierte IFN $\gamma$ /LPS-Stimulation eine starke Anreicherung von RelA im Nukleoplasma der Makrophagen. Die nukleäre Translokation von RelA in beiden Behandlungen der Makrophagen zeigt, dass die verschiedenen Stimulations-Ansätze jeweils zu der erwarteten



Aktivierung der Makrophagen führten. Zudem belegen die Immundetektionen gegen  $\alpha$ Tubulin und Lamin, dass die Cytoplasma-Nukleoplasma-Fraktionierungen der Makrophagen funktioniert haben.

Die Ergebnisse der Cytoplasma-Nukleoplasma-Fraktionierung wurden durch Immunofluoreszenz-Färbungen zur Lokalisation von TAF4B in Makrophagen verifiziert (**Abbildung 18**). Die Makrophagen wurden hierfür gleich den in der Fraktionierung verwendeten Makrophagen stimuliert. Zusätzlich wurden Makrophagen ausschließlich mit



**Abbildung 18. Die IFN $\gamma$ -Vorstimulierung der reifen Makrophagen inhibiert die LPS-induzierte Anreicherung von TAF4B im Zellkern von Makrophagen und bedingt teilweise eine Exklusion von TAF4B aus dem Zellkern.** Nachweis der TAF4B-Lokalisation in zehn Tage alten Makrophagen, welche unstimuliert waren (unstim.), eine Stunde mit LPS stimuliert wurden (+LPS 1h) sowie für 72 Stunden mit Interferon $\gamma$  (+ IFN $\gamma$ ) oder mit Interferon $\gamma$  (72 Stunden) und anschließend für eine Stunde mit LPS (+IFN $\gamma$ /LPS) stimuliert wurden. (A) Immunofluoreszenz gegen TAF4B, (B) DAPI-Färbung der DNA, (C) Überlagerung der anti-TAF4B-Immunofluoreszenz und DAPI-Färbung, (D) Phasenkontrastaufnahme der Zellen. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Zellen, in welchen TAF4B nicht im Nukleus detektiert wurde. Maßstabsbalken:= 20 $\mu$ m.

IFN $\gamma$  stimuliert, um den inhibitorischen Effekt auf die nukleäre TAF4B-Anreicherung nach LPS-Stimulation weiter zu überprüfen. In den zehn Tage alten unstimulierten Makrophagen lag TAF4B hauptsächlich im Cytoplasma und gering im Nukleus vor. Die einstündige LPS-Stimulation der Makrophagen induzierte vergleichbar zur LPS-induzierten Lokalisation in sieben Tagen alten Makrophagen (siehe **Abbildung 13**, Seite 56) die Anreicherung von TAF4B im Nukleus. Die dreitägige Stimulation ausschließlich mit IFN $\gamma$  führte zu einer Lokalisation von TAF4B im Cytoplasma und Nukleoplasma, vergleichbar zu unstimulierten Makrophagen. Zudem schien TAF4B in wenigen der IFN $\gamma$ -behandelten Makrophagen vollkommen aus dem Nukleus ausgeschlossen zu sein. In den IFN $\gamma$ -vorstimulierten Makrophagen, welche folgend mit LPS stimuliert wurden, zeigte sich eine Inhibition der Anreicherung von TAF4B im Nukleus. Auch hier lagen einige Zellen vor, in welchen kein TAF4B im Nukleus detektiert wurde.

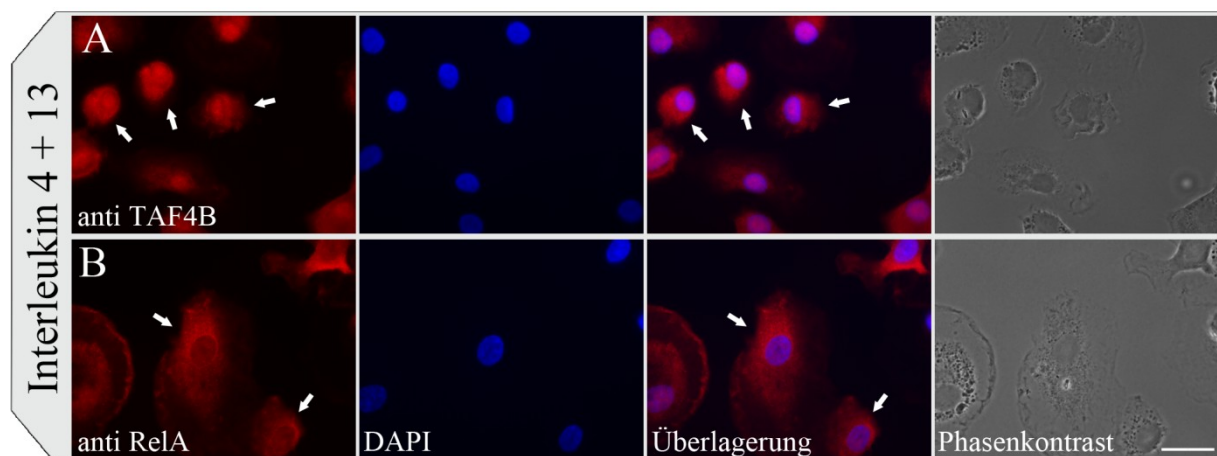
Die Immunofluoreszenz zeigt, dass TAF4B auch in zehn Tage alten Makrophagen ohne Stimulation in geringer Menge im Zellkern vorliegt. Dies steht jedoch im Gegensatz zu den Ergebnissen der Cytoplasma-Nukleoplasma-Fraktionierung, in welcher kein TAF4B im Nukleoplasma von unstimulierten Makrophagen nachgewiesen wurde (**Abbildung 17**, Seite 62). Demgegenüber zeigen die Immunfluoreszenz-Färbungen, übereinstimmend mit den Ergebnissen der Cytoplasma-Nukleoplasma-Fraktionierung, dass TAF4B nach LPS-Stimulation im Nukleus angereichert wird. Ebenfalls übereinstimmend mit der Cytoplasma-Nukleoplasma-Fraktionierung zeigen Immunfluoreszenz-Färbungen, dass die LPS-induzierte Anreicherung von TAF4B durch eine IFN $\gamma$ -Vorstimulierung inhibiert wird.

### **5.5 Die Stimulation durch die antiinflammatorischen Cytokine Interleukin 4, 10 und 13 bedingt eine spezifische Lokalisation von TAF4B in Makrophagen**

Gegenüber der Situation in proinflammatorischen M1-Makrophagen, können die Interleukine IL-4, IL-10 und IL-13 durch Sequestrierung der NF $\kappa$ B-Untereinheit RelA aus dem Nukleus zu einer Inhibition proinflammatorischer Mechanismen und zur Ausbildung von M2-Makrophagen führen. Die induzierte RelA-Sequestrierung inhibiert zum Beispiel die Expression proinflammatorischer Gene wie *tnf- $\alpha$*  und *il6*. In Makrophagen des M2-Phänotyps



werden stattdessen antiinflammatorische Gene aktiviert (Übersichtsartikel: Sica et al., 2008; Übersichtsartikel: Martinez et al., 2009). Eine induzierte Änderung hin zu einem antiinflammatorischen Transkriptionsfaktor-Repertoire im Zellkern von M2-Makrophagen könnte ebenfalls den Koaktivator TAF4B beeinflussen. Dies wäre ein Hinweis auf eine generelle immunregulatorische Rolle von TAF4B in primären Makrophagen, welche über eine proinflammatorische Funktion in LPS-aktivierten Makrophagen hinausgehen würde. Um zu bestimmen, ob eine antiinflammatorische Stimulation einen Einfluss auf die Funktion von TAF4B haben könnten, wurden sieben Tage alte Makrophagen für weitere 72 Stunden mit den Cytokinen IL-4 und IL-13 oder mit IL-4, IL-10 und IL-13 stimuliert. Die möglichen Effekte der Cytokinstimulation auf die Lokalisation von TAF4B wurden in den behandelten Makrophagen durch Immunofluoreszenz gegen TAF4B detektiert (**Abbildung 19, Reihe A**). Als Kontrolle einer adäquaten Cytokin-Stimulation der Makrophagen wurde zusätzlich die Lokalisation von RelA überprüft, welches in M2-Makrophagen hauptsächlich im Cytoplasma vorliegen sollte (Mantovani et al., 2004).



**Abbildung 19. Antiinflammatorische Stimulation reifer Makrophagen mit Interleukin 4 und 13 bedingt eine spezifische Lokalisation von TAF4B.** Primäre Makrophagen wurden für 72 Stunden mit jeweils 20 ng/ml Interleukin stimuliert, folgend wurde Immunofluoreszenz gegen TAF4B (**A**) und RelA (**B**) durchgeführt. Die DNA wurde zudem mit DAPI gegengefärbt. Zusätzlich ist die Überlagerung der jeweiligen Immundetektion und der DAPI-Färbung gezeigt, sowie Phasenkontrast-Aufnahmen der Makrophagen. Die Pfeile zeigen beispielhaft auf Zellen, in welchen TAF4B oder RelA distinkt lokalisiert ist. Maßstabsbalken = 20 µm.

Während in unstimulierten, zehn Tage alten Makrophagen TAF4B hauptsächlich im Cytoplasma und gering im Nukleus vorliegt (siehe dazu **Abbildung 18**, Seite 63), induziert die Stimulation der Zellen mit IL-4/IL-13 oder IL-4/IL-10/IL-13 eine distinkte, zelluläre Anordnung von TAF4B (die Abbildungen zur Immunfluoreszenzdetektion von TAF4B in IL-

4/IL-10/IL-13-stimulierten Zellen sind im Anhang dargestellt; **Abbildung 24**, Seite 106). Im Nukleus der Makrophagen scheint TAF4B nach der Interleukinstimulation in distinkten Bereichen konzentriert vorzuliegen, während das cytoplasmatische TAF4B perinukleär angereichert zu sein scheint. Damit spiegelt die TAF4B-Lokalisation nicht die deutliche Sequestrierung von RelA aus dem Nukleus wider (**Abbildung 19**, Reihe B). Diese Interleukin--induzierte RelA-Sequestrierung aus dem Nukleus zeigt, dass die Makrophagen auf die Stimuli wie erwartet reagiert haben (Deepak et al., 2007; Sica et al., 2008). Damit ist TAF4B möglicherweise nicht exklusiv an einer proinflammatorischen, sondern auch an einer antiinflammatorischen Transkriptionsregulation in Makrophagen beteiligt.

## 6. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der gewebespezifische Transkriptionsfaktor TAF4B in Makrophagen, jedoch nicht in Monozyten, exprimiert wird. TAF4B liegt während der *in vitro*-Differenzierung der Makrophagen hauptsächlich im Cytoplasma und zu einem geringen Teil auch im Nukleus vor. Die proinflammatorische Stimulation der reifen Makrophagen mit LPS führt zu einer nukleären Anreicherung von TAF4B, zusammen mit den NFκB-Untereinheiten RelA und cRel. Parallel dazu wurde die Transkription der putativen TAF4B-Zielgene *a20* und *tnf-α* in LPS-stimulierten Makrophagen aktiviert. Chromatin-Immunpräzipitationen konnten die Annahme bestätigen, dass TAF4B in den LPS-stimulierten Makrophagen an Zielgene bindet, eindeutig wurde eine Bindung von TAF4B an den Promotor von *tnf-α* detektiert. Eine Vorstimulation der primären Makrophagen mit IFNγ führte jedoch zu einer Inhibition der LPS-induzierten nukleären Anreicherung von TAF4B. Die antiinflammatorische Interleukinstimulation der Makrophagen führte ebenfalls zu einer distinkten Lokalisation von TAF4B in Makrophagen. Dies hindeutet darauf hin, dass TAF4B ebenfalls in antiinflammatorische Reaktionen der Makrophagen involviert sein könnte.

Damit konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in Makrophagen proinflammatorische Stimuli zu einer Aktivierung und Promotorbindung durch TAF4B führen können. Darüber hinaus führen weitere Stimuli zu jeweils distinkten Mustern der Lokalisation von TAF4B, was auf eine komplexe Regulation des Transkriptionsfaktors durch verschiedene Signalwege hindeutet.

### 6.1 Die Expression von *taf4B*, der *taf4B*-Splicevariante und *taf4* in primären Monozyten und Makrophagen

Da keine Daten in Bezug auf die Expression basaler Transkriptionsfaktoren in Monozyten und Makrophagen publiziert sind, wurde die Transkription und Proteinexpression von *taf4B*, einer möglichen *taf4B*-Splicevariante (Wu et al., 2005) und *taf4* während der Differenzierung von Makrophagen überprüft. In Monozyten und während der meisten Abschnitte der betrachteten Makrophagen-Differenzierung wurde das *taf4B*-Transkript relativ konstant detektiert (siehe **Abbildung 8 A**, Seite 46). Mit Einsetzen der Adhärenz, in eine

Stunde alten Makrophagen, lag das *taf4B*-Transkript deutlich verstärkt vor. Einhergehend mit der verstärkten *taf4B*-Transkriptmenge in den eine Stunde kultivierten Makrophagen wurde ebenfalls das TAF4B-Protein nachgewiesen (siehe **Abbildung 8 B**, Seite 46). Die vergleichsweise niedrige mRNA-Menge in Monozyten ist vermutlich nicht der Grund für eine fehlende Detektion des TAF4B-Proteins in Monozyten. Die *taf4B*-Menge war in PBMCs vergleichbar niedrig, dennoch wurde das TAF4B-Protein in PBMCs deutlich detektiert. Dies deutet darauf hin, dass die Translation der *taf4B*-mRNA in Monozyten inhibiert sein könnte und erst mit beginnender Differenzierung in Makrophagen aktiviert wird. Damit decken sich die hier erhaltenen Daten mit vorangegangenen Ergebnissen, welche zeigen, dass die *taf4B*-mRNA in verschiedenen Zelltypen vorliegt, das TAF4B-Protein jedoch nur in wenigen Zelltypen exprimiert wird (Wu et al., 2005). Eine posttranskriptionelle Regulation der TAF4B-Expression könnte über die untranslatierten Regionen der *taf4B*-mRNA gesteuert werden (Wu et al., 2005), jedoch sind hierzu keine eindeutigen Daten bekannt.

Trotz der deutlich absinkenden *taf4B*-Menge in der weiteren Entwicklung der Makrophagen bleibt das TAF4B-Protein deutlich exprimiert. Möglicherweise liegt TAF4B nach der Expression in eine Stunde alten Makrophagen sehr stabil vor. Anzunehmen ist zudem, dass die in eine Stunde alten Makrophagen initiierte Translation von TAF4B aktiv bleibt, wodurch vorliegendes TAF4B kontinuierlich durch die geringe *taf4B*-mRNA-Menge erneuert wird. TAF4B wird nicht im murinen Knochenmark exprimiert, dem Stammzell-Reservoir der Leukozyten (siehe **Abbildung 4**, Seite 17; Silkov et al., 2002). Sollte dies die Situation in der Zelllinie humaner Monozyten widerspiegeln, würde TAF4B wie hier gezeigt in der Entwicklung zu Makrophagen erst relativ spät im Stadium der einsetzenden Differenzierung zu Makrophagen exprimiert, vergleichbar zu der Situation in B-Lymphozyten (Silkov et al., 2002).

Die erhöhte Menge des *taf4B*-Transkriptes und einsetzende TAF4B-Expression in eine Stunde alten Makrophagen lassen zudem vermuten, dass die einsetzende Adhärenz der Makrophagen die Expression des TAF4B-Proteins induziert. Adhärenz stellt einen starken Stimulus für Monozyten dar. Die Zellmorphologie verändert sich, die Transkription und Expression zahlreicher Gene wird beeinflusst (Mao et al., 1986; Diatchenko et al., 2005; Valledor et al., 2006). Einige Daten aus anderen Arbeiten unterstützen diese Hypothese. So sind möglicherweise PKA- und PI-3- sowie MAP-Kinase-Signalwege in Granulosazellen des murinen Ovars in die Aktivierung der *taf4B*-Transkription involviert (Ongeri et al., 2007). Diese Signalwege werden ebenfalls durch Adhärenz in Makrophagen aktiviert (Berton and

Lowell, 1999; Kao and Liu, 2002). Es wäre aus diesem Grund möglich, dass die gezeigte *taf4B*-Transkription in Makrophagen durch Einsetzen der Adhärenz und Aktivierung von Kinase-Signalwegen verstärkt wird. Jedoch ist es nicht auszuschließen, dass Komponenten des verwendeten Zellkultur-Mediums die beginnende TAF4B-Expression aktivieren (Kreutz et al., 1992). Hierfür wäre es hilfreich, frisch elutrierte Monozyten für eine Stunde auf einem Roller in einem 50 ml-Falcongefäß zu kultivieren. Die Zellen könnten durch die ständige Bewegung nicht oder kaum an der drehenden Plastikwandung adhären (persönliche Kommunikation, Prof. Dr. Marina Kreutz, Universitäts-Klinikum Regensburg). Sollte TAF4B in dieser Zellkultur nicht exprimiert werden, wäre dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass TAF4B initial Adhärenz-induziert translatiert wird.

Gegenüber dem deutlichen Anstieg der Menge der *taf4B*-mRNA in eine Stunde alten Makrophagen, lag die Menge des Transkripts einer möglichen *taf4B*-Splicevariante relativ konstant während der Monozyten-Makrophagen-Entwicklung vor (siehe **Abbildung 8 A**, Seite 46). Die verkürzte TAF4B-Splicevariante besitzt das Epitop des hier verwendeten Antikörpers (Dikstein et al., 1996). Insofern exprimiert, sollte die Splicevariante damit durch den hier verwendeten Antikörper detektiert werden. Die Immundetektion gegen TAF4B ergab eine zusätzliche Bande im Proteinextrakt der eine Stunde und 24 Stunden alten Makrophagen, was auf die Expression der TAF4B-Splicevariante hindeuten könnte. Es zeigt sich, dass diese mögliche TAF4B-Variante nicht vergleichbar zu TAF4B stabil in Makrophagen vorliegt, sondern in 24 Stunden alten Makrophagen schwächer detektiert wird. Das C-terminale Proteinende der TAF4B-Variante wäre verkürzt und könnte der Grund für eine Instabilität und die Degradation der TAF4B-Variante mit fortschreitender Entwicklung der Makrophagen sein (siehe **Abbildung 8 B**, Seite 46). Da bis jetzt keine eindeutigen Ergebnisse zur tatsächlichen und stabilen Proteinexpression des verkürzten *taf4B*-Alternativtranskriptes vorliegen, diese verkürzte TAF4B-Variante aber mit der Transkription von TAF4B-Zielgenen interferieren könnte (Wu et al., 2005), wäre es sinnvoll die eindeutige Expression der Splicevariante in zukünftigen Arbeiten zu belegen.

Das Transkript von *taf4* lag im Vergleich zu PBMCs in Monozyten deutlich verstärkt vor und wurde dann relativ konstant in den differenzierenden Makrophagen nachgewiesen. Ob mit einer erhöhten Menge der *taf4*-mRNA auch das TAF4-Protein in Monozyten stärker im Vergleich zu den übrigen Zelltypen der PBMC-Population exprimiert wird, ist unklar, da das TAF4-Protein nicht durch einen Western-Blot nachgewiesen werden konnte. Das TAF4-Protein wurde auch in Proteinextrakt von Hela-Zellen nicht detektiert, obwohl TAF4 hier

exprimiert wird (Vassallo and Tanese, 2002). Warum TAF4 selbst nach Abänderung des Protokolls nicht durch einen Western-Blot detektiert werden konnte kann nicht gesagt werden. Demgegenüber zeigte die Immunfluoreszenz eine Expression und nukleäre Lokalisation von TAF4 in adhärenenten Makrophagen (siehe **Abbildung 9**, Seite 48). TAF4 wurde in wenigen Makrophagen ab drei Tagen Kultivierung teilweise schwach oder nicht durch die Immunfluoreszenz detektiert. Die Zahl der TAF4-negativen Makrophagen nahm mit fortschreitender Kulturdauer bis zu sieben Tagen augenscheinlich nicht zu. Dies deutet weniger auf eine progressive Abnahme der TAF4-Menge mit zunehmender Differenzierung in der gesamten Makrophagen-Population hin; vielmehr könnte es sein, dass TAF4 spezifisch in einigen Subpopulationen der kultivierten Makrophagen ab etwa drei Tagen nicht mehr exprimiert wird. Die elutrierte, humane Monozyten-Population besteht aus Subpopulationen, welche in bestimmten morphologischen und funktionellen Charakteristika variieren können (Übersichtsartikel: Auffray et al., 2009). Dies ist wahrscheinlich auch ein Grund für eine Heterogenität von Makrophagen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Yasaka et al., 1981; Andreessen et al., 1986). Möglicherweise wird TAF4 demnach in bestimmten Makrophagen-Subpopulationen nicht mehr exprimiert.

### **6.2 Die partielle Kolokalisation von TAF4B mit TAF4 und aktiver RNA-Pol II deutet auf eine mögliche Rolle von TAF4B in der Differenzierung von Makrophagen hin**

Der Übergang von schwimmenden Monozyten zu adhärenenten Makrophagen stellt eine transkriptionell aktive Phase in der Differenzierung dar (Liu et al., 2008; Valledor et al., 2006). TAF4B wurde während dieser Phase exprimiert (siehe **Abbildung 8**, Seite 46) und lokalisierte im Nukleus der eine Stunde alten Makrophagen (siehe **Abbildung 9**, Seite 48). Die nukleäre Lokalisation könnte darauf hindeuten, dass TAF4B zu diesem Zeitpunkt der Differenzierung in die Transkription involviert ist. Nukleäres TAF4B ist möglicherweise auch in der weiteren Differenzierung der Makrophagen notwendig, da auch in der weiteren Entwicklung der Makrophagen TAF4B kontinuierlich im Nukleus detektiert wurde. TAF4B wurde durch Stimulation mit bakteriellen Lipopolysacchariden im Nukleus von Makrophagen

angereichert (siehe **Abbildung 13**, Seite 56). Deswegen wurde geprüft, ob eine mögliche bakterielle Kontamination der Zellkultur für die nukleäre Lokalisation von TAF4B verantwortlich sein könnte. Die cytoplasmatische Lokalisation von RelA in eine Stunde alten und reifen Makrophagen deutet jedoch auf einen ruhenden Zustand der Zellen hin. Die Annahme, dass die kultivierten Makrophagen nicht aufgrund einer Kontamination aktiviert vorlagen, wurde weiter durch die fehlende *il6*-Transkription in reifen, unstimulierten Makrophagen belegt. Dies deutet darauf hin, dass TAF4B in unstimulierten Makrophagen an der Transkription differenzierungsrelevanter Gene oder Haushaltsgene beteiligt ist. Diese Annahme konnte durch die Kolokalisation von TAF4B und aktiver RNA-Pol II in eine Stunde alten Makrophagen gestützt werden (siehe **Abbildung 10**, Seite 50). Damit deutet die partielle Kolokalisation von TAF4B und der aktiven RNA-Pol II darauf hin, dass TAF4B an der aktiven Transkription in dieser frühen Phase der Makrophagen-Differenzierung beteiligt ist.

Eine Kolokalisation des nukleären TAF4B und TAF4 zeigte sich in der Immunofluoreszenz nur partiell. Dies könnte darauf hindeuten, dass TAF4B-Moleküle in Makrophagen nur teilweise nukleäre TAF4B:TAF4-Heterodimeren ausbilden. Dies stünde in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten, welche zeigen, dass TAF4B als Heterodimer in Interaktion mit TAF4 im TFIID-Komplex vorliegen kann (Liu et al., 2008). Der gegen die aktive RNA-Pol II verwendete Antikörper erkennt spezifisch die Serin5-Phosphorylierung der CTD. Inaktive oder aktive RNA-Pol II, welche nicht in der Transkriptionsinitiations-Phase vorliegen, stellen demnach kein Epitop des verwendeten Antikörpers dar (Phatnani and Greenleaf, 2006; Egloff and Murphy, 2008). Zudem enthalten TFIID-Komplexe zu einem Teil TAF4-Homodimere und zu einem anderen Teil TAF4B:TAF4-Heterodimere (Dikstein et al., 1996). Es ist aus diesem Grund nicht überraschend, dass TAF4B und aktive RNA-Pol II nicht vollständig kolokalisieren.

In verschiedenen Arbeiten wurde die Promotorbindung verschiedener Gene durch TAF4B gezeigt, welche in Makrophagen ebenfalls notwendig in der Zelldifferenzierung sind (siehe **Tabelle 8**). Die Transkriptionsregulation durch TAF4B wird vermutlich aber nicht alleinig durch die Bindeaffinität der DNA-Bindedomäne bestimmt. Die Präsenz von TAF4 und die Bindung verschiedener Aktivatoran an mögliche TAF4B-Zielgene scheint zudem die TAF4B-Funktion zu regulieren (Ainbinder et al., 2002; Mengus et al., 2005). Aus diesem Grund können die in **Tabelle 8** gezeigten Gene nur als Hinweis auf mögliche TAF4B-Zielgene in Makrophagen gesehen werden. In Monozyten und eine Stunde alten Makrophagen wurde

möglicherweise eine TAF4B-Splicevariante detektiert (**Abbildung 8 B**, Seite 46; Wu et al., 2005). Es kann damit nicht ausgeschlossen werden, dass in eine Stunde alten Makrophagen durch die Ko-Immunofluoreszenzfärbungen gegen aktive RNA Pol II und TAF4B teilweise

**Tabelle 8. Aus anderen Zelltypen bekannte TAF4B-Zielgene welche eine Funktion in der Makrophagen-Differenzierung besitzen.**

Zielgen	Funktion in Makrophagen
<i>c-jun</i> <sup>1</sup>	Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors AP-1. Ist involviert in Differenzierung von Monozyten-Zelllinie (Behre et al., 1999). Durch LPS-aktiviertes c-Jun ist notwendig für <i>tnf-α</i> -Expression in Makrophagen (Hambleton et al., 1996; Liu et al., 2000).
<i>follistatin</i> <sup>2</sup>	Sezerniertes Glykoprotein mit Funktion in Differenzierung und Immunreaktion durch Inhibition von Activin und anderen Wachstumsfaktoren (De Kretser et al., 2012).
<i>integrin alpha 6</i> ( <i>itga6/ cd49f</i> ) <sup>3</sup>	Transmembranprotein, das die Adhärenz von Makrophagen an extrazelluläre Matrix vermittelt. Stark hochreguliert in Makrophagen und wahrscheinlich involviert in die Makrophagen-Differenzierung (Shaw et al., 1990; Ammon et al., 2000; Shi and Simon, 2006)

<sup>1</sup> (Geles et al., 2006; W. Liu et al., 2008); <sup>2</sup> (Geles et al., 2006); <sup>3</sup> (Kalogeropoulou et al., 2010)

die mögliche TAF4B-Variante detektiert wird (**Abbildung 10**, Seite 50). Aufgrund des Fehlens der C-terminal gelegenen TFIID-Interaktionsdomäne könnte durch die TAF4B-Splicevariante eine TAF4B-bedingte Transkription des Gens blockiert werden (Wu et al., 2005). Die mögliche Splicevariante könnte also eine wichtige Rolle in der Transkriptionsregulation von Monozyten und jungen Makrophagen übernehmen. Da die zusätzliche Bande in sieben Tage alten Makrophagen nicht mehr detektiert wurde, sollte hier die Möglichkeit der Transkriptionsregulation durch die TAF4B-Splicevariante auszuschließen sein. Sollte die TAF4B-Variante eine Rolle in den differenzierenden Makrophagen spielen, könnten sich verschiedene Modi der TAF4B-Regulation durch die TAF4B-Variante ergeben. Die TAF4B-Variante könnte mit TAF4B um die Bindung von Zielgenen konkurrieren. Möglicherweise wirkt die TAF4B-Splicevariante jedoch aktivierend auf TAF4B. In *Caenorhabditis elegans* inhibieren OMA-Proteine die transkriptionelle Funktion von TAF4 durch Sequestrierung des Transkriptionsfaktors in das Cytoplasma



(Guven-Ozkan et al., 2008). Homologe Mechanismen könnten in Säugetieren existieren und TAF4 oder TAF4B inhibieren. Die TAF4B-Splicevariante könnte durch Bindung der inhibitorischen Proteinfaktoren TAF4B substituieren und dadurch die Inhibition von TAF4B blockieren.

Das ubiquitäre TAF4 wurde in eine Stunde und 24 Stunden alten Makrophagen populationsweit detektiert. Ab drei bis sieben Tagen Kultivierung war TAF4 jedoch in einer geringen Anzahl der Makrophagen deutlich reduziert oder nicht detektierbar (siehe **Abbildung 9**, Seite 48). Die Anzahl TAF4-negativer Makrophagen nahm mit voranschreitender Kultivierung augenscheinlich nicht zu. Dies führt zu der Annahme, dass TAF4 spezifisch in distinkten Makrophagen-Subpopulationen ab einer gewissen Differenzierung nicht weiter exprimiert wird. TAF4 ist notwendig für die Integrität des TFIID-Komplexes, kann aber in Abwesenheit vermutlich durch TAF4B substituiert werden (Cler et al., 2009). Da alle Makrophagen in Kultur kontinuierlich TAF4B exprimierten (siehe **Abbildung 9**, Seite 48), integrieren in den TAF4-negativen Makrophagen möglicherweise TAF4B:TAF4B-Dimere in den TFIID-Komplex. Versuche zeigen, dass embryonische Fibroblastenzellen trotz einer Depletion von TAF4 vital bleiben, jedoch eine globale Änderung der Transkription bedingt wird. Diese Versuche führen weiter zu der Annahme, dass ein spezifisches Gleichgewicht zwischen nukleären TAF4 und TAF4B notwendig ist für eine regulierte Transkription (Mengus et al., 2005). Zusammen mit diesen Daten könnte die Immunofluoreszenz darauf hindeuten, dass TAF4 in bestimmten Makrophagen-Subpopulationen durch TAF4B im TFIID-Komplex substituiert wird und so ein distinktes Transkriptom induziert wird. Ein kontrollierter Stopp der TAF4-Expression und die verstärkte Integration von TAF4B in den TFIID könnte mit voranschreitender Reifung der Makrophagen einen Mechanismus zur weiteren Differenzierung in distinkte Makrophagen-Phänotypen darstellen.

Ein *knock down* von *taf4B* mit anschließendem ChIP und einer qRT-PCR-Auswertung der Transkription könnte putative TAF4B-Zielgene aufzeigen, welche für die weitere Differenzierung von Monozyten oder Makrophagen notwendig sind. Mit sieben Tage alten Makrophagen durchgeführte *knock down*-Experimente erbrachten jedoch keine reproduzierbaren Effekte (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies ist wahrscheinlich durch das verwendete Zellkulturprotokoll bedingt, welches von den Herstellerangaben des Transfektions-Kits abweicht (siehe Hersteller-Protokoll LONZA „AMAXA-Human Macrophage Nucleofector Kit“, VAPA-1008 PC). Die vom Hersteller vorgeschlagene

Kultivierung der Makrophagen in M-CSF-haltigen Medium bedingt jedoch eine antiinflammatorische Differenzierung von Makrophagen (Verreck et al., 2006; Fleetwood et al., 2012; Sica et al., 2008). Die Ergebnisse aus Versuchen mit solch kultivierten Makrophagen wären aufgrund der unterschiedlichen Differenzierung der Makrophagen möglicherweise nicht vergleichbar mit den hier erhaltenen Ergebnissen.

### **6.2.1 TAF4B scheint Polycomb-Proteine in Makrophagen nicht durch eine nukleoläre Sequestrierung zu regulieren**

Polycomb-Komplexe reprimieren u.a. durch posttranslationale Modifikation der Histone H3 und H2A die Transkription von Zielgenen (Übersichtsartikel: Morey and Helin, 2010). Die nukleoläre Sequestrierung der Polycomb-Proteine durch tTAFs in *D. melanogaster* scheint diese Genrepression aufzuheben. Aufgrund der nukleolären Sequestrierung der Polycomb-Proteine wird durch die TAF-Paraloge vermutlich die Transkription von postmeiotischen Genen mit Relevanz für die Differenzierung der Spermien aktiviert (Chen et al., 2005). Zudem ist das ubiquitäre TAF4 in Embryonen von *D. melanogaster* Teil des PRC1 (Saurin et al., 2001), was darauf hindeutet, dass eine Interaktion zwischen TAFs und Polycomb-Untereinheiten nicht ausschließlich testisspezifisch ist. Da TAF4 in Metazoen konserviert ist (Übersichtsartikel: Freiman, 2009), wäre es möglich, dass die Interaktion mit Polycomb-Proteinen ebenso in differenzierenden Zellen von Säugetieren einen genregulatorischen Mechanismus darstellt. Um diese These zu prüfen, wurde hier die mögliche nukleoläre Lokalisation von TAF4B in Makrophagen durch Ko-Immunofluoreszenz gegen TAF4B und nukleoläres Fibrillarin nachgewiesen. Unabhängig vom Differenzierungsstadium der Makrophagen lag TAF4B jedoch nicht angereichert an den Fibrillarin-positiven Bereichen im Nukleolus vor, sondern hier deutlich geringer als im übrigen Nukleus (siehe **Abbildung 11**, Seite 51). Sollte TAF4B vergleichbar zu Annahmen von Chen et al. (2005) indirekt die Transkription durch die Sequestrierung von Polycomb-Proteinen regulieren, dann werden die TAF4B-gebundenen Faktoren vermutlich nicht in den Nukleolus sequestriert.

In eine Stunde sowie sieben Tage alten Makrophagen wurde zudem die Lokalisation der Polycomb-Proteine EZH2 und Ring1A überprüft. Keines der Polycomb-Proteine wurde in den primären Makrophagen an den Fibrillarin-positiven Nukleoli detektiert, sondern im Nukleus und im Cytoplasma (Dembeck, Bachelorarbeit, 2011). Dies deutet weiter darauf hin, dass der

Mechanismus einer nukleolären Polycomb-Sequestrierung durch TAF4B in primären Makrophagen nicht vorliegt. Ebenfalls verbleibt ein großer Anteil des TAF4B-Proteins, unabhängig von der Stimulation, im Cytoplasma. Die Inhibition der repressiven Polycomb-Effekte auf die Transkription könnte in Säugetierzellen auch durch eine TAF4B-abhängige Polycomb-Sequestrierung in das Cytoplasma ermöglicht werden. Da verschiedene Polycomb-Proteine auch in weiteren Zelltypen cytoplasmatisch lokalisieren (Witte et al., 2004; Su et al., 2005; Dembeck, 2011), könnte eine cytoplasmatische Polycomb-Sequestrierung auch in weiteren Säugetierzelltypen einen Mechanismus der Genregulation darstellen.

Die tTAFs sind teilweise gering konserviert im Vergleich zu humanen Homologen (Chen et al., 2005; Hiller et al., 2004). Dennoch besitzt der konservierte C-Terminus von Nht Histon-Falte-Domänen, welche sowohl vergleichbar zu *Drosophila*-TAF4 als auch zu humanem TAF4 und TAF4B zu sein scheinen. Dieser Bereich scheint notwendig für verschiedene Protein-Interaktionen von TAF4B zu sein und könnte auch für die Interaktion mit Polycomb-Proteinen eine Rolle spielen (Hiller et al., 2004; Shao et al., 2005; Guven-Ozkan et al., 2008). Neben tTAFs interagiert auch das ubiquitäre TAF4 in Embryonen von *D. melanogaster* mit PRC1 (Saurin et al., 2001). Zusammen mit den konservierten HFD im C-Terminus der TAF4-Homologe deutet dies darauf hin, dass die Interaktion zwischen TAFs und Polycomb-Komplexen nicht exklusiv im Testis von *D. melanogaster* stattfinden muss. Es zeigt sich vielmehr, dass die Lokalisation der Polycomb-Proteine zelltypabhängig ist. Im Gegensatz zur Situation in primären Makrophagen akkumuliert EZH2 in Hela-Zellen deutlich in der Nähe des Nukleolus (Dembeck, Bachelorarbeit, 2011). Zellen aus *Drosophila*-Embryonen, Hela-Zellen und primären Spermatozyten treten im Gegensatz zu kultivierten, primären Makrophagen in die Mitose bzw. Meiose ein. Möglicherweise ist die Chromatin-Restrukturierung während der Zellteilung notwendig für die Polycomb-Lokalisation in oder an den Nukleoli.

### 6.3 Regulation von TAF4B nach Aktivierung der Makrophagen mit LPS und den Cytokinen IFN $\gamma$ oder Interleukinen

Die proinflammatorische Stimulation durch LPS oder Cytokine wie IFN $\gamma$  induziert in Makrophagen die Ausbildung eines M1-Phänotyps, welcher u.a. gekennzeichnet ist durch distinkte Transkriptionsmuster und die erhöhte Expression verschiedener Cytokine und Rezeptoren zur Pathogenerkennung (Übersichtsartikel: Mantovani et al., 2004). Durch T-Lymphozyten sezerniertes IFN $\gamma$  wirkt zudem verstärkend auf die proinflammatorische Reaktion und LPS-induzierte Transkription von Makrophagen (Lee and Sullivan, 2001). Nach Stimulation durch IL-4, IL-10 und IL-13 können Makrophagen hingegen einen antiinflammatorischen M2-Phänotyp ausbilden (Erwig et al., 1998). Im Vergleich zu M1-Makrophagen wird in M2-Makrophagen ebenfalls ein spezifisches Transkriptom induziert, durch die Blockierung der nukleären Anreicherung von RelA, während der Aktivator STAT6 in den Nukleus transloziert (Übersichtsartikel: Biswas and Mantovani, 2010). Die verschiedenen Stimulationen der Makrophagen bedingen damit spezifische Lokalisationsmuster von Transkriptionsfaktoren. Um Hinweise auf mögliche Regulationsmechanismen von TAF4B zu erhalten, wurde die Lokalisation von TAF4B nach proinflammatorischer oder antiinflammatorischer Stimulation überprüft. Eine LPS-Stimulation reifer Makrophagen führte zur erhöhten Expression und nukleären Anreicherung von TAF4B (siehe **Abbildung 13**, Seite 56). TAF4B schien zudem in LPS-stimulierten Makrophagen in distinkterer Lokalisation im Nukleus vorzuliegen. Ein deutlicher Anteil von TAF4B bleibt aber trotz anhaltender LPS-Stimulation nach fünf Stunden im Cytoplasma zurück. Dies scheint vergleichbar zu Ergebnissen aus Zellen des adaptiven Immunsystems. Hier liegt TAF4B im unstimulierten Zustand sowohl im Cytoplasma als auch im Kern vor und wird nach einem LPS-Stimulus im Nukleus angereichert (Rashevsky-Finkel et al., 2001). Weitestgehend sind synergistische Effekte der IFN $\gamma$ -und LPS-Stimulation auf Makrophagen aufgezeigt (Schroder et al., 2004), IFN $\gamma$  kann jedoch auch eine modulierende Wirkung auf LPS-induzierte Effekte besitzen (Collart et al., 1986; Hayes et al., 1995). Die proinflammatorische IFN $\gamma$ -Vorstimulierung inhibierte hier in den Makrophagen die LPS-induzierte Zunahme der nukleären TAF4B-Menge (siehe Abschnitt 5.4, Seite 61). IFN $\gamma$  schien zudem in einer geringen Anzahl der Makrophagen eine Exklusion von TAF4B aus dem Nukleus zu bedingen. Trotz Inhibition der LPS-induzierten Anreicherung im Nukleus IFN $\gamma$ -vorstimulierter Makrophagen, lag TAF4B gering in den meisten dieser Makrophagen

im Nukleus vor was eine regulative Funktion von TAF4B in der Transkription hier nicht vollständig ausschließt. Während das Immunofluoreszenzprotokoll eine geringe Menge an TAF4B im Nukleus IFN $\gamma$ -behandelter Makrophagen aufzeigte, war durch die Nukleoplasma-Cytoplasma-Fraktionierung kein TAF4B im Nukleoplasma gleichwertig behandelter Makrophagen zu detektieren. Dies könnte damit zusammenhängen, dass die nukleäre TAF4B-Menge unterhalb der Nachweisgrenze des verwendeten Western Blot-Protokolls lag. Um die Interleukin-bedingte Differenzierung in einen antiinflammatorischen M2-Phänotyp aufzuzeigen, wurde die cytoplasmatische RelA-Sequestrierung in Interleukin-behandelten Makrophagen überprüft und bestätigt (siehe **Abbildung 19 B**, Seite 65; Sica et al., 2008). Es zeigte sich, dass TAF4B nicht gleichsam zu RelA aus dem Nukleus der M2-Makrophagen sequestriert wird (siehe **Abbildung 19 A**, Seite 65). In den Interleukin-stimulierten Makrophagen scheint TAF4B in einem distinkten Bereich des Zellkerns lokalisiert, mit scharfer Abtrennung an der Grenzregion des Zellkerns. Die spezifische Lokalisation von TAF4B in LPS- oder Interleukin-stimulierten Makrophagen könnte darauf hindeuten, dass TAF4B Stimulus-abhängig an transkriptionell aktive DNA-Bereiche lokalisiert wird (siehe Schneider and Grosschedl, 2007).

Es ist wenig bekannt über die Regulation der Lokalisation basaler Transkriptionsfaktoren wie TAF4B. Eine nukleäre Anreicherung von TAF4B durch passive Diffusion sollte unwahrscheinlich sein. Die Diffusion von Proteinen mit einer Größe von 110 kDa konnte nur vereinzelt aufgezeigt werden und erklärt zudem nicht die Stimulus-abhängige Translokation von TAF4B in oder aus dem Nukleus (Wang and Brattain, 2007). C-terminal enthält TAF4B nach der Aminosäure 552 ein putatives NLS (nukleäres Lokalisations-Signal) sowie ein NES (nukleäres Export-Signal; Rashevsky-Finkel et al., 2001). Durch NLS-Mapper ([http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS\\_Mapper\\_form.cgi](http://nls-mapper.iab.keio.ac.jp/cgi-bin/NLS_Mapper_form.cgi)) wurden im C-terminalen TAF4B-Abschnitt ebenfalls mehrere zweiteilige Kernlokalisationssequenzen mit niedriger, nukleärer Lokalisations-Aktivität vorhergesagt. Im Gegensatz dazu wurden in der Proteinsequenz von TAF4 mehrere einteilige NLS sowie zweiteilige Kernlokalisationssequenzen mit starker Lokalisations-Aktivität vorhergesagt. Die Ergebnisse dieses Vergleichs der nukleären Lokalisations-Signale stimmen überein mit der Beobachtung einer ausschließlich nukleären Lokalisation von TAF4 im Gegensatz zu TAF4B (siehe **Abbildung 9**, Seite 48). Dies deutet darauf hin, dass TAF4B eine schwache NLS mit geringer Affinität zu Importin- $\alpha$  besitzt (Hodel et al., 2001). Ob die Lokalisation von TAF4B ausschließlich durch die NLS und den klassischen Importin  $\alpha/\beta$ -Mechanismus vermittelt wird, bleibt jedoch unklar (Rashevsky-

Finkel et al., 2001). Möglicherweise ist die Stimulus-bedingte Anreicherung von TAF4B im Nukleus nicht alleinig abhängig von einer schwachen NLS. Es wäre auch möglich, dass TAF4B an Proteine wie induzierte Aktivatoren bindet, welche Stimulus-induziert in den Nukleus translozieren. So könnte TAF4B „huckepack“ in den Nukleus mittransportiert werden. Jedoch bindet TAF4B unabhängig von RelA an Promotor-Regionen (Ainbinder et al., 2002) und zeigt keine zu RelA oder cRel vergleichbare Oszillation zwischen Cytoplasma und Nukleoplasma (siehe Abschnitt 5.3.2, Seite 55). Zudem liegt TAF4B nicht zusammen mit RelA im Nukleus IFN $\gamma$ /LPS-stimulierter Makrophagen vor, lokalisiert aber im Gegensatz zu RelA im Nukleus Interleukin-stimulierter Makrophagen. Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität von TAF4B relativ unabhängig zu NF $\kappa$ B reguliert wird. Es wäre ebenso möglich, dass TAF4B durch die C-terminale HFD in den Nukleus vermittelt wird. Verschiedene TAFs bilden cytoplasmatische Dimere durch konservierte HFDs und translozieren als Komplex in den Nukleus (Komeili and O'Shea, 2000; Soutoglou et al., 2005). Auch TAF4 und TAF4B interagieren durch HFDs mit TAF12 und integrieren in den TFIID-Komplex (Gazit et al., 2009; Nakamura and Seydoux, 2008). Diese Interaktion mit TAF12 scheint zumindest für TAF4 notwendig, um in den Zellkern zu translozieren und könnte auch für TAF4B eine Rolle spielen (Guven-Ozkan et al., 2008). In *C. elegans* konkurrieren OMA1 und 2 nach Phosphorylierung durch MBK-2 mit TAF12 um die Bindung der TAF4-HFD, was zu einer cytoplasmatischen Sequestrierung von TAF4 und globalen Stilllegung der Transkription führt (Guven-Ozkan et al., 2008). Ein zu *C. elegans* homologer Mechanismus scheint in humanen Zellen zu existieren, ebenso wie die Kinase DYRK2, ein MBK-2-Homolog (Guven-Ozkan et al., 2008). DYRK2 phosphoryliert verschiedene Transkriptionsfaktoren und reguliert zudem möglicherweise TAF4 (Gwack et al., 2006; Brunkhorst et al., 2005; Taira et al., 2012). Kinasen wie DYRK2 könnten Stimulus-abhängig nukleäre oder cytoplasmatische Bindepartner von TAF4B regulieren und dadurch die nukleäre Anreicherung von TAF4B induzieren.

### 6.3.1 Regulation der Bindung von TAF4B an Promotorelemente

Sowohl TAF4B als auch TAF4 interagieren mit TAF12 und binden durch Elemente im stark konservierten C-terminalen Proteinbereich an Promotoren (Shao et al., 2005; Gazit et al., 2009). Versuche mit synthetischen Promotor-Sequenzen zeigen, dass TAF4B und TAF4 vermutlich um die Bindung einer distinkten Promotorregion konkurrieren können (Liu et al., 2008). Dabei ist die intrinsische Affinität des TAF4B-oder TAF4-Proteins für Promotorsequenzelemente vermutlich gering und nicht alleinig verantwortlich für die Promotorbindung (Shao et al., 2005; Gazit et al., 2009). Vielmehr wird angenommen, dass durch TAF4B eine Konformationsänderung des TFIID-Proteinkomplexes induziert wird und dies verantwortlich ist für eine Promotorspezifität des Holo-TFIID-Komplexes (Shao et al., 2005; Liu et al., 2008b). Auch ein bestimmtes Verhältnis der nukleären Menge von TAF4B zu TAF4 ist vermutlich notwendig für die Regulation von TAF4B, da die Transkriptionsaktivität von TAF4B auch durch die Konkurrenz mit nukleären TAF4 reguliert zu werden scheint (Mengus et al., 2005). In Übereinstimmung mit diesen Daten steht die hier gezeigte Anreicherung von TAF4B im Nukleus LPS-induzierter Makrophagen und die damit einhergehende Induktion der *tnf- $\alpha$* -Bindung (siehe **Abbildung 16**, Seite 60). Die Anreicherung und gleichzeitige Promotorbindung von TAF4B deutet darauf hin, dass die Erhöhung der nukleären TAF4B Menge in den primären Makrophagen einen Mechanismus zur aktivierten Genregulation durch TAF4B darstellt.

Stimulus-abhängig könnte die Transkriptionsaktivität von TAF4B durch posttranslationelle Modifikationen des TAF4B-Proteins beeinflusst werden. Cytoplasmatisches und nukleäres TAF4B wird im Gegensatz zu TAF4 und der möglichen TAF4B-Splicevariante nach Aktivierung des Adenyl-Zyklase-gekoppelten Rezeptors durch Proteinkinase A (PKA) phosphoryliert. Jedoch hat die Phosphorylierung keinen Einfluss auf die Translokation von TAF4B in den Nukleus (Wu et al., 2005), könnte aber eine Rolle in der Integration von TAF4B in den Transkriptionskomplex spielen. Verschiedene basale Transkriptionsfaktoren (u.a. TAF4) werden Zellzyklus-abhängig oder Stimulus-induziert phosphoryliert, was teilweise notwendig ist für die Protein-Protein-Interaktion (Biggs et al., 1998; Pijnappel et al., 2009). Auch in Makrophagen bedingt der LPS-Stimulus die Aktivierung der PKA-und MAP-Kinase-Signalwege, was zur Phosphorylierung von TAF4B führen könnte (Sweet and Hume, 1996). Die Phosphorylierung von TAF4B nach einer LPS-Stimulation (Wu et al., 2005) wurde in dieser Arbeit nicht bestätigt (siehe **Abbildung 12**, Seite 53). Eine Protein-

phosphorylierung von TAF4B in LPS-aktivierten Makrophagen kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, es kann ebenso möglich sein, dass die phosphorylierte TAF4B-Fraktion zu gering war für die Detektion durch das hier verwendete Western Blot-Protokoll. Sollte es möglich sein die Regulation der TAF4B-Aktivität aufzuklären, so könnte eingegrenzt werden, durch welchen Mechanismus IFN $\gamma$  die LPS-induzierte Translokation von TAF4B inhibiert. Anhand der Transkription von *tnf- $\alpha$*  wurde aufgezeigt, dass IFN $\gamma$  nicht rein verstärkend auf LPS-induzierte Effekte wirkt, sondern auch eine modulierende Funktion besitzt (Collart et al., 1986; Hayes et al., 1995). Die durch IFN $\gamma$  verstärkte Histon-Acetylase und Deacetylase-Aktivität sowie die Transkription IFN $\gamma$ -aktivierter Gene durch TBP-freie Transkriptionskomplexe zeigt darüber hinaus, dass IFN $\gamma$  einen weitreichenden Effekt auf die Organisation der Transkriptionsmaschinerie ausübt (Paulson et al., 2002; Keslacy et al., 2007; Garrett et al., 2008). Versuche zeigen zudem durch die Inhibition von Kinasen, dass die IFN $\gamma$ -Vorstimulierung von Makrophagen zu einer Signaltransduktion des LPS-Stimulus über einen alternativen Signalweg zu führen scheint (Hayes et al., 1995). Dies führt zu der Annahme, dass IFN $\gamma$ -bedingte Effekte Interaktionspartner von TAF4B inhibieren, welche für die Translokation von TAF4B in den Zellkern der Makrophagen benötigt werden.

Die Interleukin-spezifische Lokalisation von TAF4B könnte darauf hindeuten, dass TAF4B in M2-Makrophagen mit induzierten Aktivatoren interagiert und die Transkription reguliert (Gordon and Martinez, 2010; Woodward et al., 2010). Zudem ist TAF4B in einigen Zelltypen an der Transkription von Genen beteiligt, welche ebenfalls Interleukin-induziert durch M2-Makrophagen exprimiert werden (*tgfb $\beta$ 1*, *tgfb $\beta$ 3* und *ctgf*; Übersichtsartikel: Davidson et al., 2005) (Martinez et al., 2009; Rodero and Khosrotehrani, 2010). Möglicherweise interagiert TAF4B in M2-Makrophagen mit den hier induzierten Transkriptionsfaktoren wie STAT6 oder p50 (Porta et al., 2009; Übersichtsartikel: Biswas and Mantovani, 2010). Durch Verbindung der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion zur Transkription würde TAF4B damit notwendig für die Initiierung pro-und antiinflammatorischer Transkriptionsmuster sein. Dadurch wäre TAF4B essentiell für die Plastizität der Makrophagen-Differenzierung in M1- oder M2-Phänotypen.



### 6.3.2 Die spezifische Bindung von TAF4B an *tumor necrosis factor alpha* zusammen mit cRel und RelA

TAFs stellen Koaktivatoren dar, welche zwischen Aktivatoren und dem promotorgebundenen Präinitiationskomplex vermitteln (Übersichtsartikel: Thomas and Chiang, 2006). Die Erkennung von LPS durch den CD14:TLR4-Rezeptorkomplex induziert die Translokation aktivierter NFκB-Untereinheiten in den Nukleus, welche u.a. den Promotor von *tnf-α* und *a20* binden (Falvo et al., 2010; Verstrepen et al., 2010). Der Koaktivator TAF4B interagiert u.a. mit RelA und cRel, bindet jedoch unabhängig von Aktivatoren an Promotoren (Wolstein et al., 2000; Yamit-hezi et al., 2000). Die LPS-induzierte Anreicherung von TAF4B im Nukleus der reifen Makrophagen (siehe **Abbildung 13**, Seite 56) deckt sich zeitlich mit der stark erhöhten Transkription von *a20* und *tnf-α* nach LPS-Stimulation (siehe **Abbildung 12 C**, Seite 53). Die durchgeführten ChIP-Experimente zeigen, dass die einstündige LPS-Stimulation die Bindung von TAF4B an den aktivierten Promotor von *tnf-α* in primären Makrophagen bedingt (siehe **Abbildung 16**, Seite 60). Weiter wurde die bekannte Bindung der NFκB-Untereinheiten RelA und cRel an den aktiven *tnf-α*-Promotor hier bestätigt (Falvo et al., 2010) und zudem erstmals die Bindung von cRel an den *a20*-Promotor in primären Makrophagen aufgezeigt.

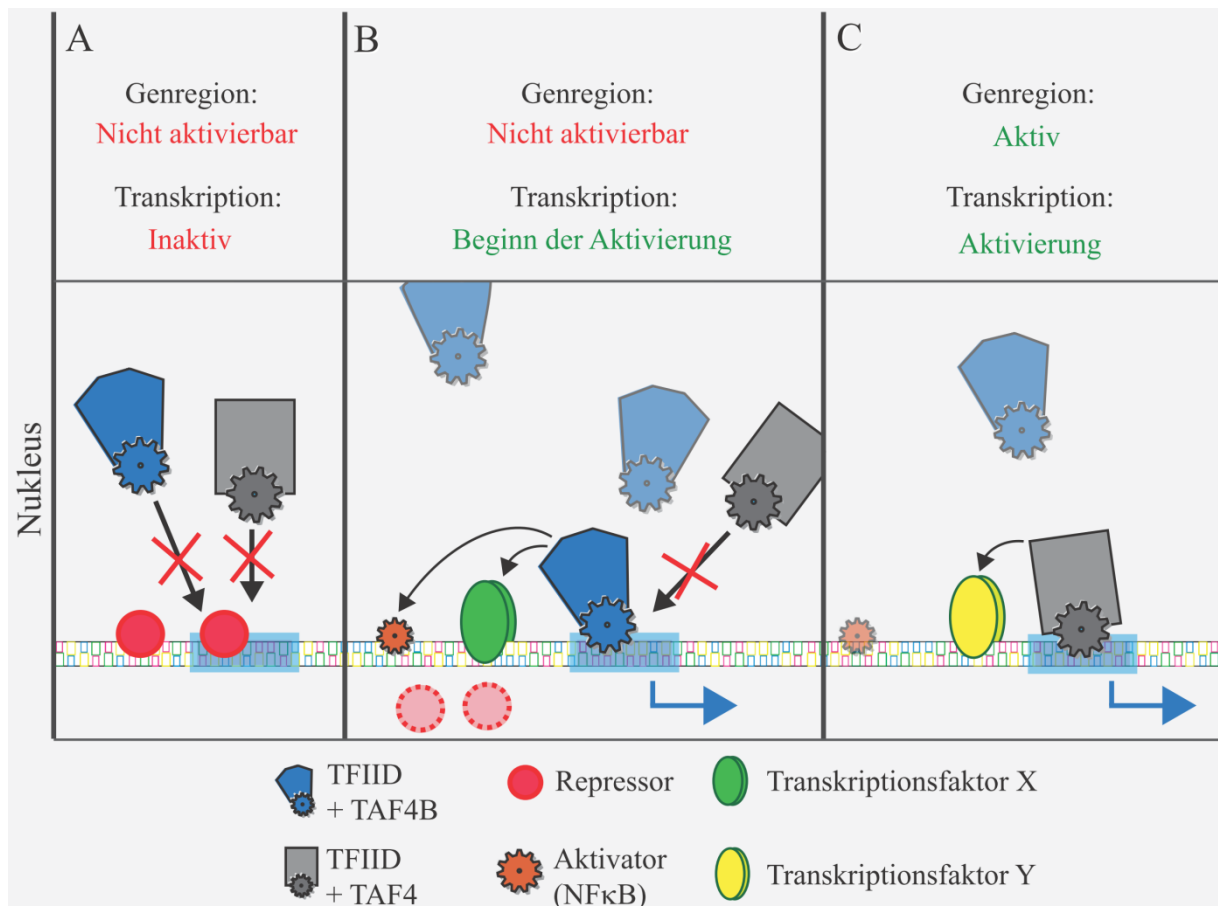
Eine Bindung von TAF4B an den *a20*-Promotor konnte in primären Makrophagen nicht aufgezeigt werden, Versuche vorheriger Arbeiten bestätigen aber, dass TAF4B eine lediglich geringe Bindungsaffinität zum *a20*-Promotor besitzt (Gazit et al., 2009). Zudem wurde eine direkte Bindung des Promotors des antiapoptotischen Faktors *a20* durch TAF4B bis jetzt nicht in primären Zellen belegt und könnte durch den Krebszell-Charakter der verwendeten Zelllinien bedingt sein (Ainbinder et al., 2002; Silkov et al., 2002). Auch ist es möglich, dass *a20* in diesen Zelllinien durch distinkte Transkriptionskomplexe gebunden wird. Die verwendeten Jurkat-und Daudi-Zelllinien exprimieren den Zelltyp-spezifischen Aktivator OCA-B/BOB-1, welcher mit TAF4B interagiert (Ainbinder et al., 2002; Silkov et al., 2002; Marafioti et al., 2003). Dies könnte auch darauf hindeuten, dass die Bindung und Regulation von *a20* durch endogenes TAF4B lediglich in distinkten Zelltypen auftritt. Zudem wird die *a20*-Expression durch TNF-α induziert (Übersichtsartikel: Vereecke et al., 2009). TNF-α besitzt pleiotrope Funktionen und ist u.a. notwendig in der Embryogenese sowie Homöostase verschiedener Gewebe wie z.B. Ovarien (Adashi et al., 1989; Zolti et al., 1990; Balkwill,

2009; Pfeffer, 2003). Aus diesem Grund könnte die Reduktion von *a20* in TAF4B-Mutanten (Freiman et al., 2001; Silkov et al., 2002; Voronina et al., 2007) einen indirekten Effekt aufgrund reduzierter TNF- $\alpha$ -Proteinmengen darstellen.

Warum Makrophagen im Vergleich zu Monozyten deutlich verstärkt dazu in der Lage sind TNF- $\alpha$  zu bilden, könnte die hier gezeigte Bindung von *tnf- $\alpha$*  durch TAF4B erklären (MacKenzie et al., 2002). Da das TAF4B-Protein in Monozyten nicht exprimiert wird (siehe **Abbildung 8**, Seite 46), könnte in Monozyten vorliegendes TAF4 eine geringe Transkription von *tnf- $\alpha$*  bedingen. In adhärennten Makrophagen exprimiert, könnte TAF4B durch eine spezifische Promotoraffinität und aufgrund der LPS-induzierten Zunahme der nukleären TAF4B-Menge an *tnf- $\alpha$*  binden und TAF4 hier ersetzen. Vorangegangenen Arbeiten zeigen, dass TAF4B einen Koaktivator für die NF $\kappa$ B-induzierte Transkription darstellt (Yamit-hezi and Dikstein, 1998; Yamit-hezi et al., 2000). Auch in reifen Makrophagen ermöglicht die Integration von TAF4B in den TFIID-Komplex vermutlich die spezifische Interaktion mit RelA und cRel und induziert so wahrscheinlich die wesentlich potentere *tnf- $\alpha$* -Transkription in Makrophagen.

Eine IFN $\gamma$ -Vorstimulierung führt in Makrophagen zur einer verstärkten *tnf- $\alpha$* -Expression, aufgrund der Bindung des *tnf- $\alpha$* -Promotors durch eine inaktive RNA-Pol II sowie weiterer Transkriptionsfaktoren (Hayes et al., 1995; Falvo et al., 2010). Zudem inhibiert IFN $\gamma$  vermutlich die Bindung des *tnf- $\alpha$* -Gens durch Transkriptionsrepressoren und induziert eine erhöhte Histon-Acetylierung was zu einem transkriptionell aktiven Chromatin-Zustand führt (Collart et al., 1986; Garrett et al., 2008). Die Vorstimulation der Makrophagen mit IFN $\gamma$ , vorangehend zu einer LPS-Stimulation, führte allerdings hier zu einer Abnahme bis Depletion der nukleären TAF4B-Menge (**Abbildung 18**, Seite 63). Dies macht es wahrscheinlich, dass *tnf- $\alpha$*  in IFN $\gamma$ -behandelten Makrophagen nicht LPS-induziert durch TAF4B gebunden wird. Der IFN $\gamma$ -bedingte, Transkriptions-kompetente Zustand der *tnf- $\alpha$* -Promotorregion könnte erklären, aus welchem Grund TAF4B in humanen Makrophagen unnötig für die Transkriptionsaktivierung von *tnf- $\alpha$*  nach einer IFN $\gamma$ -Vorstimulation sein könnte (**Abbildung 20**). Dem unstimulierten Zustand der Makrophagen entsprechend, liegt der *tnf- $\alpha$* -Locus in einem reprimierten, inaktiven Zustand vor (Collart et al., 1986). Werden ruhende Makrophagen ohne vorherige IFN $\gamma$ -Vorstimulierung mit pathogenen Mustern (LPS) konfrontiert, so muss vermutlich erst die Repression des *tnf- $\alpha$* -Genlocus überwunden werden. Nach Überwindung des reprimierten Genzustandes könnte TAF4B durch die spezifische

Interaktion mit Transkriptionsfaktoren an den reprimierten *tnf- $\alpha$* -Promotor rekrutiert werden (**Abbildung 20 B**). Die weitere Aktivierung des *tnf- $\alpha$* -Genlocus und die Initiation der Transkription bedingt TAF4B vermutlich durch die Interaktion mit RelA und cRel (Collart et al., 1986). Diese Annahme wird gestützt durch Ergebnisse von Koutroubas et al. (2008). Koutroubas und Kollegen zeigen in Hela-Zellen anhand von synthetischen Enhancer-Konstrukten des *ifn $\beta$* -Genpromotors, dass RelA trotz Abwesenheit einer aktiven Histon-Acetylierung an NF $\kappa$ B-Enhancersequenzen des *ifn $\beta$* -Promotors binden kann. Dies ermöglicht



**Abbildung 20. Schema der hypothetischen Funktionsweise von TAF4B in der Transkriptionsaktivierung.** A) Die *tnf- $\alpha$* -Genregion liegt in einem inaktiven, reprimierten Zustand vor. Weder TAF4B- noch TAF4-enthaltende TFIID-Komplexe können mit dem *tnf- $\alpha$* -Promotor interagieren. B) Ein Stimulus (z.B. LPS) induziert die Anreicherung von TAF4B im Nukleus sowie die Bindung eines spezifischen Transkriptionsfaktors X an den *tnf- $\alpha$* -Genregion, welcher den TAF4B-enthaltenden TFIID an den *tnf- $\alpha$* -Promotor rekrutiert. Einhergehend mit der Etablierung eines aktiven Zustands und Bindung von RelA an der Genregion wird die Transkription von *tnf- $\alpha$*  initiiert. C) Die *tnf- $\alpha$* -Genregion liegt in einem etablierten, aktiven Zustand vor, gebundene Transkriptionsfaktoren rekrutieren den TAF4-enthaltenden TFIID und die Transkription wird initiiert.

die Aktivierung der Genregion, die Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie und die Transkription des Gens. Die Überwindung eines repressiven Genzustandes und die Aktivierung der Transkription aufgrund der spezifischen Interaktion von gewebespezifischen TAF-Paralogen und Transkriptionsfaktoren, stellt vermutlich auch die Funktion der tTAFs in der Spermatogenese von *D. melanogaster* dar (siehe Chen et al., 2005). Nach Vorstimulierung der Makrophagen mit IFN $\gamma$ , liegt *tnf- $\alpha$*  in einem transkriptionell kompetenten Zustand vor (**Abbildung 20 C**). Dieser Zustand wird durch eine zellspezifische Zusammenstellung von Aktivatoren, Chromatin-regulierenden Faktoren und weiteren Transkriptionsfaktoren definiert (Collart et al., 1986; Fischle et al., 2003; Garrett et al., 2008). Diese IFN $\gamma$ -induzierte Zusammenstellung von Transkriptionsfaktoren könnte mit dem ubiquitären TAF4 interagieren und die Ausführung der Transkription nach einem folgenden LPS-Stimulus bedingen. Das *a20*-Gen wird in Makrophagen und weiteren Geweben konstitutiv auf basalem Level transkribiert (Park et al., 2011; Liang et al., 2012). Vermutlich liegt damit der *a20*-Genlocus in einem transkriptionell kompetenten Zustand vor. Möglicherweise wird TAF4B aufgrund der hier gebundenen Transkriptionsfaktoren in Makrophagen nicht an den *a20*-Promotor rekrutiert.

Zusammengefasst führt dies zu der Annahme, dass die Bindung eines TAF4B-enthaltenden TFIID an Zielgene nicht strikt durch Promotorsequenzen festgelegt ist. Vielmehr ist vermutlich die spezifische, Gen-gebundene Zusammenstellung transkriptionsregulierender Faktoren ausschlaggebend für die Bindung und Aktivität des TAF4B-enthaltenden TFIID. Proteine wie zum Beispiel TAF1 und Chromatin-regulierende Faktoren wie Bromodomänen-Proteine und Polycomb-Proteine binden durch spezifische Domänen an Proteinmodifikationen wie z.B. Acetylierungen und regulieren auf diesem Weg die Transkription (Fischle et al., 2003; Übersichtsartikel: Yang, 2004). Möglicherweise wird TAF4B durch die spezifische Interaktion mit einem der Chromatin-regulierenden Faktoren an Zielgene rekrutiert.

Unterschiedliche TFIID-Komplexe welche z.B. TAF4B oder TAF4 enthielten, könnten sich demnach gegenseitig, abhängig von spezifischen Stimuli, an Genpromotoren ersetzen, um durch die jeweiligen TAFs auf eine distinkte Zusammenstellung von Transkriptionsfaktoren flexibel zu reagieren. Diese Hypothese könnten durch Chromatin-Immunopräzipitation von TAF4B und TAF4 in IFN $\gamma$ -und LPS-behandelten Makrophagen belegt werden. Aufgrund der Inhibition der LPS-induzierten TAF4B-Anreicherung im Nukleus der Makrophagen, sollte der Promotor von *tnf- $\alpha$*  hiernach durch TAF4, jedoch nicht durch TAF4B gebunden sein.

NFκB-Proteine scheinen in einigen Fällen nicht notwendig für eine LPS-induzierte Transkription von *tnf-α* in Makrophagen zu sein (Übersichtsartikel: Falvo et al., 2010). Ob RelA nach einer IFNγ-Vorstimulation der Makrophagen notwendig ist für eine LPS-bedingte Transkriptionsaktivierung von *tnf-α*, trotz einer möglichen IFNγ-induzierten Abwesenheit von TAF4B an *tnf-α*, müsste aus diesem Grund geklärt werden.

## 7. Ausblick

Die in dieser Arbeit gezeigte Abhängigkeit der Lokalisation von TAF4B und die Bindung an *tnf- $\alpha$*  könnte Anlass geben die Funktion von TAF4B in Makrophagen als Effektor-Zellen des angeborenen Immunsystems weiter zu beleuchten. Die hier erhaltenen Ergebnisse sollten mit *in vivo*-Daten weiter ergänzt werden, durch die immunhistologische Detektion von TAF4B an Orten der Inflammation. Hierfür könnten sowohl humane als auch Maus-Gewebeschnitte aus inflammatorischen Gewebe verwendet werden. Eine Detektion von TAF4B im Nukleus von Makrophagen in entzündetem Gewebe würde die Rolle von TAF4B in Entzündungs-Reaktionen weiter aufklären.

Die Auswirkungen verschiedener Stimuli auf Signalwege in Makrophagen sind teilweise genau bekannt. Darüber hinaus stehen die regulatorischen Faktoren und Promotorelemente der Transkription von immunregulatorischen Genen wie *ifn $\beta$*  und *tnf- $\alpha$*  seit geraumer Zeit im Focus zahlreicher Arbeiten. Aus diesem Grund könnte die Stimuli-induzierte Transkription von TAF4B-Zielgenen in Makrophagen ein wertvolles Werkzeug darstellen um aufzuzeigen, von welchen Signalwegen TAF4B reguliert wird und an welche Promotoren TAF4B bindet. Genomweite ChIP-Experimente an adäquat stimulierten Makrophagen könnten Aufschluss geben über eine Funktion von TAF4B oder TAF4 in der Transkription von M1- oder M2-Makrophagen. So könnte TAF4B in einigen Zelltypen an der Transkription weiterer proinflammatorischer und antiinflammatorischer (*tgfb $\beta$ 1*, *tgfb $\beta$ 3*, *ctgf*) Gene beteiligt sein.

Während der Entwicklung von Monozyten zu reifen Makrophagen verändert sich die Zusammenstellung der Transkriptionsfaktoren der Zellen. Massenpektrometrieanalysen könnten mögliche Interaktionspartner von TAF4B in Transkriptionskomplexen aufzeigen und weiter klären wodurch TAF4B an Promotoren rekrutiert werden könnte.

Zudem sollte prinzipiell die Expression und transkriptionelle Funktion der möglichen TAF4B-Splicevariante überprüft werden. Immunpräzipitationen gegen TAF4B und TBP mit einer anschließenden Überprüfung des präzipitierten Proteinkomplexes mit Hilfe von Massenspektrometrieanalysen könnten Aufschluss darüber geben, ob eine verkürzte TAF4B-Splicevariante exprimiert und in den TFIID-Komplex integriert wird.

Die TAF-abhängige Induktion einer spezifischen Polycomb-Lokalisation würde einen neuen Mechanismus der Transkriptionsregulation in Säugetierzellen darstellen. Erste Hinweise auf eine zellzyklusabhängige Lokalisation von Polycomb-Proteinen könnte die Immunofluoreszenz gegen Polycomb-Untereinheiten in zellzyklussynchronisierten Hela-

Zellen ergeben (Knehr et al., 1995; Takita et al., 2003). Die Prüfung der Koloalstion verschiedener TAFs und Polycomb-Proteine im Cytoplasma oder Nukleolus könnte durch Ko-Immunofluoreszenz durchgeführt werden. Ein nachfolgender *knock down* verschiedener TAFs könnte weiter Aufschluss geben über die Abhängigkeit der Lokalisation von Polycomb-Proteinen von TAFs. Interaktionsexperimente (Ko-Immunpräzipitations-Versuche, Hefe-Zwei-Hybrid-Versuche) würden eine direkte oder indirekte Interaktion von spezifischen Domänen der TAF-und Polycomb-Proteine weiter verifizieren.

Es könnte überprüft werden, ob eine Phosphorylierung zur Verstärkung oder Inhibition der Aktivität von TAF4B führt oder vergleichbar zu TBP notwendig für Proteininteraktionen ist (Biggs et al., 1998). Da *in vivo* sowohl TBP als auch verschiedene TAFs phosphoryliert werden (Biggs et al., 1998; Pijnappel et al., 2009), wäre durch Zellkultur-Versuche nicht zu unterscheiden ob die Phosphorylierung von TAF4B oder einem Interaktionspartner zur Proteininteraktion beiträgt. Aus diesem Grund sollte ein möglicher Effekt der TAF4B-Phosphorylierung auf eine Proteininteraktion *in vitro* durch Immunpräzipitations-Versuche nachgewiesen werden. Das TAF4B-Protein oder mögliche Bindepartner (TBP, TAF4, TAF12) können durch Vektor-basierte Expressions-Systeme zellfrei *in vitro* oder in Bakterien exprimiert werden. Nach Phosphorylierung eines der exprimierten Interaktionspartner (*in vitro* oder durch zelluläre Forskolin-Stimulation; Wu et al., 2005) könnten Immunpräzipitations-Versuche gegen den putativen Interaktionspartner in Säugetierzelllysat oder zellfreien Versuchsansätzen durchgeführt werden.

Die Fehlregulation von *tnf-α* oder IL-4, IL-10 und IL-13 kann in pathogenen Zuständen ebenfalls zur Aktivierung von Makrophagen führen. Diese Makrophagen sezernieren u.a. IL-10 und Wachstumsfaktoren wie TGF-β und VEGF, wodurch z.B. die Tumorprogression unterstützt wird (Sica et al., 2008; Wynes and Riches, 2003; Balkwill, 2009; Pfeffer, 2003). Die weitere Aufdeckung der Transkriptionsregulation in Makrophagen kann aus diesem Grund dazu beitragen, Ursachen und Effekte von fehlregulierten Immunzellen aufzudecken.

## 8. Literaturverzeichnis

- Adashi, E. Y., Resnick, C. E., Croft, C. S., and Payne, W. (1989). Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  ! Inhibits Gonadotropin Hormonal Action in Nontransformed Ovarian Granulosa. *The Journal of biological chemistry* 264, 11591–11597.
- Ainbinder, E., Revach, M., Wolstein, O., Moshonov, S., Diamant, N., and Dikstein, R. (2002). Mechanism of rapid transcriptional induction of tumor necrosis factor  $\alpha$ -responsive genes by NF- $\kappa$ B. *Molecular and cellular biology* 22, 6354–6362. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=135646&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Akira, S., Uematsu, S., and Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16497588> [Accessed July 15, 2010].
- Albright, S. R., and Tjian, R. (2000). TAFs revisited : more data reveal new twists and confirm old ideas. *In Vitro* 242, 1–13.
- Ammon, C., Meyer, S. P., Schwarzfischer, L., Krause, S. W., Andreesen, R., and Kreutz, M. (2000). Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells. *Immunology* 100, 364–369. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2327027&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Andreesen, R., Bross, K. J., Osterholz, J., and Emmrich, F. (1986). Human macrophage maturation and heterogeneity: analysis with a newly generated set of monoclonal antibodies to differentiation antigens. *Blood* 67, 1257–1264. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3008886>.
- Arnosti, D. N., and Kulkarni, M. M. (2005). Transcriptional enhancers: Intelligent enhanceosomes or flexible billboards? *Journal of cellular biochemistry* 94, 890–898. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15696541> [Accessed October 8, 2012].
- Auffray, C., Sieweke, M. H., and Geissmann, F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual review of immunology* 27, 669–692. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132917> [Accessed June 13, 2011].
- Balkwill, F. (2009). Tumour necrosis factor and cancer. *Nature reviews. Cancer* 9, 361–371. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19343034>.
- Becker, S., Quay, J., and Soukup, J. (1991). Cytokine (tumor necrosis factor, IL-6, and IL-8) production by respiratory syncytial virus-infected human alveolar macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 147, 4307–4312. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1753101>.
- Behre, G., Whitmarsh, J., Coghlan, M. P., Hoang, T., Carpenter, C. L., Zhang, D. E., Davis, R. J., and Tenen, D. G. (1999). c-Jun is a JNK-independent coactivator of the PU.1 transcription factor. *The Journal of biological chemistry* 274, 4939–4946. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9988737>.



- Berger, S. L. (2002). Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development* 12, 142–148. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11893486>.
- Berton, G., and Lowell, C. a (1999). Integrin signalling in neutrophils and macrophages. *Cellular signalling* 11, 621–635. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10530871>.
- Biggs, R. J., Ahn, G. N., and Kraft, S. A. (1998). Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in U937 Leukemic Cells induce Phosphorylation of the Amino Terminus of the TATA-Binding Protein. *Cell Growth & Differentiation* 9, 667–676.
- Biswas, S. K., and Mantovani, A. (2010). Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nature Immunology* 11, 889–896. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.1937> [Accessed September 20, 2010].
- Blackwell, T. K., and Walker, A. K. (2008). OMA-gosh, where's that TAF? *Cell* 135, 18–20. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854150> [Accessed September 6, 2012].
- Boisvert, F.-M., Van Koningsbruggen, S., Navascués, J., and Lamond, A. I. (2007). The multifunctional nucleolus. *Nature reviews. Molecular cell biology* 8, 574–585. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17519961>.
- Boone, D. L., Turer, E. E., Lee, E. G., Ahmad, R.-C., Wheeler, M. T., Tsui, C., Hurley, P., Chien, M., Chai, S., Hitotsumatsu, O., et al. (2004). The ubiquitin-modifying enzyme A20 is required for termination of Toll-like receptor responses. *Nature immunology* 5, 1052–1060. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15334086> [Accessed July 20, 2012].
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* 72, 248–254. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
- Brunkhorst, A., Karle, M., Shi, J., Mikolajczyk, M., Nelson, M. A., Metsis, M., and Hermanson, O. (2005). A specific role for the TFIID subunit TAF4 and RanBPM in neural progenitor differentiation. *Molecular and Cellular Neuroscience* 29, 250–258.
- Chen, J., Ghazawi, F. M., and Li, Q. (2010). Interplay of bromodomain and histone acetylation in the regulation of p300-dependent genes. *Epigenetics* 5, 1–7.
- Chen, X., Hiller, M., Sancak, Y., Fuller, M. T., and Fuller-, M. T. (2005). Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. *Science (New York, N.Y.)* 310, 869–872. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16272126> [Accessed October 26, 2012].
- Chen, Z., and Manley, J. L. (2003). In vivo functional analysis of the histone 3-like TAF9 and a TAF9-related factor, TAF9L. *The Journal of biological chemistry* 278, 35172–35183. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12837753> [Accessed November 11, 2012].
- Chorro, L., Sarde, A., Li, M., Woollard, K. J., Chambon, P., Malissen, B., Kissenpfennig, A., Barbaroux, J.-B., Groves, R., and Geissmann, F. (2009). Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *The Journal of experimental medicine* 206, 3089–3100. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2806478&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 17, 2012].

- Cler, E., Papai, G., Schultz, P., Davidson, I., Papai, Æ. G., and Schultz, Æ. P. (2009). Recent advances in understanding the structure and function of general transcription factor TFIID. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66, 2123–2134. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308322> [Accessed October 4, 2012].
- Cohen, P. E., Nishimura, K., Zhu, L., and Pollard, J. W. (1999). Macrophages: important accessory cells for reproductive function. *Journal of leukocyte biology* 66, 765–772. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10577508>.
- Colgan, J., and Manley, J. L. (1992). TFIID can be rate limiting in vivo for TATA-containing, but not TATA-lacking, RNA polymerase II promoters. *Genes & Development* 6, 304–315. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.6.2.304> [Accessed November 19, 2012].
- Collart, M. A., Baeuerle, P., and Vassalli, P. (1990). Regulation of Tumor Necrosis Factor Alpha Transcription in Macrophages : Involvement of Four KB-Like Motifs and of Constitutive and Inducible Forms of NF-KB. *Molecular and Cellular Biology* 10, 1498–1506.
- Collart, M. A., Belin, D., Vassalli, J.-D., Kossoda, S., Vassalli, P., Kossodo, S., and Vassali, P. (1986). Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors. *J. Exp. Med* 164, 2113–2118.
- Conti, L., Hiscott, J., Wainberg, M. A., Gessani, S., G, S., and Davis, Lady (1997). Induction of relA(p65) and I kappa B alpha subunit expression during differentiation of human peripheral blood monocytes to macrophages. *Cell Growth & Differentiation* 8, 435–442.
- Davidson, I., Kobi, D., Fadloun, A., and Mengus, G. (2005). New insights into TAFs as regulators of cell cycle and signaling pathways. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4, 1486–1490. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16205117>.
- Deepak, P., Kumar, S., and Acharya, a (2007). Interleukin-13-induced type II polarization of inflammatory macrophages is mediated through suppression of nuclear factor-kappaB and preservation of IkappaBalpha in a T cell lymphoma. *Clinical and experimental immunology* 149, 378–386. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1941949&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Dembeck, A. (2011). POLYCOMB - seine Rolle bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen.
- Deng, B., Wehling-Henricks, M., Villalta, S. A., Wang, Y., and Tidball, J. G. (2012). IL-10 triggers changes in macrophage phenotype that promote muscle growth and regeneration. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 189, 3669–3680. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22933625> [Accessed October 15, 2012].
- Diatchenko, L., Romanov, S., Malinina, I., Clarke, J., Tchivilev, I., Li, X., and Makarov, S. S. (2005). Identification of novel mediators of NF-kappaB through genome-wide survey of monocyte adherence-induced genes. *Journal of leukocyte biology* 78, 1366–1377. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16204640>.
- Dikstein, R., Zhou, S., and Tjian, R. (1996). Human TAFII 105 is a cell type-specific TFIID subunit related to hTAFII130. *Cell* 87, 137–146. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8858156>.

- Dobrovolskaia, M. a, and Vogel, S. N. (2002). Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 903–914. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12106783>.
- Dvir, A. (2002). Promoter escape by RNA polymerase II. *Biochimica et biophysica acta* 1577, 208–223. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12213653>.
- Egloff, S., and Murphy, S. (2008). Cracking the RNA polymerase II CTD code. *Trends in genetics : TIG* 24, 280–288. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18457900> [Accessed July 26, 2010].
- Erwig, L., Kluth, D. C., Walsh, G. M., and Rees, A. J. (1998). Initial Cytokine Exposure Determines Function of Macrophages and Renders Them Unresponsive to Other Cytokines. *The Journal of Immunology* 161, 1983–1988.
- Fairweather, D., and Cihakova, D. (2010). Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 33, 222–230.
- Falender, A. E., Freiman, R. N., Geles, K. G., Lo, K. C., Hwang, K., Lamb, D. J., Morris, P. L., Tjian, R., and Richards, J. S. (2005). Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. *Genes & development* 19, 794–803. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1074317&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 18, 2010].
- Falvo, J. V, Tsytsykova, A. V, and Goldfeld, A. E. (2010). Transcriptional control of the TNF gene. *Current directions in autoimmunity* 11, 27–60. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20173386>.
- Fearon, D. T., and Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science (New York, N.Y.)* 272, 50–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8600536>.
- Fischle, W., Wang, Y., and Allis, C. D. (2003a). Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 172–183. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0955067403000139> [Accessed July 14, 2010].
- Fischle, W., Wang, Y., Jacobs, S. a, Kim, Y., Allis, C. D., and Khorasanizadeh, S. (2003b). Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes & development* 17, 1870–1881. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12897054>.
- Fiskus, W., Pranpat, M., Balasis, M., Herger, B., Rao, R., Chinnaiyan, A., Atadja, P., and Bhalla, K. (2006). Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 5, 3096–3104.
- Fleetwood, A. J., Lawrence, T., Hamilton, J. A., and Cook, A. D. (2012). Implications for CSF Blockade in Profiles and Transcription Factor Activities: Phenotypes Display Differences in Cytokine Macrophage CSF-Dependent Macrophage Colony-Stimulating Factor (CSF) and Granulocyte-Macrophage Inflammation. *The Journal of Immunology* 178, 5245–5252.

- Fomproix, N., Gébrane-Younès, J., and Hernandez-Verdun, D. (1998). Effects of anti-fibrillarin antibodies on building of functional nucleoli at the end of mitosis. *Journal of cell science* 111 ( Pt 3, 359–372. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9427684>.
- Freiman, R. N. (2009). Specific variants of general transcription factors regulate germ cell development in diverse organisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1789, 161–166. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874939909000169> [Accessed October 9, 2012].
- Freiman, R. N., Albright, S. R., Chu, L. E., Zheng, S., Liang, H., Sha, W. C., and Tjian, R. (2002). Redundant Role of Tissue-Selective TAF II 105 in B Lymphocytes. *Society* 22, 6564–6572.
- Freiman, R. N., Albright, S. R., Zheng, S., Sha, W. C., Hammer, R. E., and Tjian, R. (2001). Requirement of tissue-selective TBP-associated factor TAFII105 in ovarian development. *Science (New York, N.Y.)* 293, 2084–2087. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11557891> [Accessed July 26, 2012].
- Garrett, S., Dietzmann-Maurer, K., Song, L., and Sullivan, K. E. (2008). Polarization of primary human monocytes by IFN-gamma induces chromatin changes and recruits RNA Pol II to the TNF-alpha promoter. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 180, 5257–5266. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18390706>.
- Gazit, K., Moshonov, S., Elfakess, R., Sharon, M., Mengus, G., and Davidson, I. (2009). TAF4 / 4b TAF12 Displays a Unique Mode of DNA Binding and Is Required for Core Promoter Function of a Subset of Genes. *Journal of Biological Chemistry* 284, 26286 –26296.
- Geissmann, F., Manz, M. G., Jung, S., Sieweke, M. H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (New York, N.Y.)* 327, 656–661. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2887389&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 4, 2011].
- Geles, K. G., Freiman, R. N., Liu, W.-L., Zheng, S., Voronina, E., and Tjian, R. (2006). Cell-type-selective induction of c-jun by TAF4b directs ovarian-specific transcription networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2594–2599. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1413803&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Gessani, S., Testa, U., Varano, B., Di Marzio, P., Borghi, P., Conti, L., Barberi, T., Tritarelli, E., Martucci, R., and Seripa, D. (1993). Enhanced production of LPS-induced cytokines during differentiation of human monocytes to macrophages. Role of LPS receptors. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 151, 3758–3766. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7690813>.
- Ghosh, S., May, M. J., and Kopp, E. B. (1998). NF- κ B AND REL PROTEINS : Evolutionarily Conserved Mediators of Immune Responses. *Annual review of immunology* 16, 225–260.
- Goh, F. G., Thomson, S. J. P., Krausgruber, T., Lanfrancotti, A., Copley, R. R., and Udalova, I. a (2010). Beyond the enhanceosome: cluster of novel κB sites downstream of the human IFN-β gene is essential for lipopolysaccharide-induced gene activation. *Blood* 116, 5580–5588. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855868>.

- Gordon, S., and Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 32, 593–604. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1074761310001731> [Accessed July 19, 2011].
- Güven-Ozkan, T., Nishi, Y., Robertson, S. M., and Lin, R. (2008). Global transcriptional repression in *C. elegans* germline precursors by regulated sequestration of TAF-4. *Cell* 135, 149–160. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854162>.
- Gwack, Y., Sharma, S., Nardone, J., Tanasa, B., Iuga, A., Srikanth, S., Okamura, H., Bolton, D., Feske, S., Hogan, P. G., et al. (2006). A genome-wide *Drosophila* RNAi screen identifies DYRK-family kinases as regulators of NFAT. *Nature* 441, 646–650. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16511445> [Accessed October 3, 2012].
- Hall, B. F., Mellors, I. W., and Al, G. A. N. E. T. (1991). Interleukin-6 Expression in Primary Macrophages Infected with Hiv-, Human Immunodeficiency Virus-1 (HIV-1). *AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES* 7.
- Hambleton, J., Weinstein, S. L., Lemt, L., Defrancots, A. L., and Bishop, J. M. (1996). Activation of c-Jun N-terminal kinase in bacterial lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *Immunology* 93, 2774–2778.
- Hamilton, J. A. (1993). Colony stimulating factors , cytokines some controversies. *Immunology Today* 14, 18–24.
- Hayes, M. P., Freeman, S. L., and Donnelly, R. P. (1995). IFN-gamma priming of monocytes enhances LPS-induced TNF production by augmenting both transcription and mRNA stability. *Cytokine* 7, 427–435. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7578980>.
- Hayes, M. P., and Zoon, K. C. (1993). Priming of human monocytes for enhanced lipopolysaccharide responses : expression of Priming of Human Monocytes for Enhanced Lipopolysaccharide Responses : Expression of Alpha Interferon , Interferon Regulatory Factors , and Tumor Necrosis Factor. *Infection and Immunity* 61, 3222–3227.
- Hiller, M., Chen, X., Pringle, M. J., Suchorolski, M., Sancak, Y., Viswanathan, S., Bolival, B., Lin, T., Marino, S., and Fuller, M. T. (2004). Testis-specific TAF homologs collaborate to control a tissue- specific transcription program. *Wild*, 5297–5308.
- Hitotsumatsu, O., Ahmad, R.-C., Tavares, R., Wang, M., Philpott, D., Turer, E. E., Lee, B. L., Shiffin, N., Advincula, R., Malynn, B. a, et al. (2008). The ubiquitin-editing enzyme A20 restricts nucleotide-binding oligomerization domain containing 2-triggered signals. *Immunity* 28, 381–390. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18342009> [Accessed September 11, 2012].
- Hodel, M. R., Corbett, a H., and Hodel, a E. (2001). Dissection of a nuclear localization signal. *The Journal of biological chemistry* 276, 1317–1325. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11038364> [Accessed October 24, 2012].
- Janeway, C. a, Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. J. (2001). *Immuno biology THE IMMUNE SYSTEME IN HEALTH AND DISEASE* 5th ed. D. Schank, P. Austin, E. Lawrence, and M. Morales, eds. (Garland Publishing).
- Kalogeropoulou, M., Voulgari, A., Kostourou, V., Sandaltzopoulos, R., Dikstein, R., Davidson, I., Tora, L., and Pintzas, A. (2010). TAF4b and Jun/activating protein-1 collaborate to regulate the

- expression of integrin  $\alpha 6$  and cancer cell migration properties. *Molecular cancer research* : MCR 8, 554–568. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20353996>.
- Kao, W. J., and Liu, Y. (2002). Cellular signaling involved in macrophage adhesion and FBGC formation as mediated by ligand –. *INTRACELLULAR SIGNALING*, 478–487.
- Kearns, J. D., Basak, S., Werner, S. L., Huang, C. S., and Hoffmann, A. (2006). IkappaBepsilon provides negative feedback to control NF-kappaB oscillations, signaling dynamics, and inflammatory gene expression. *The Journal of cell biology* 173, 659–664. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2063883&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Keslacy, S., Tliba, O., Baidouri, H., and Amrani, Y. (2007). Inhibition of tumor necrosis factor-alpha-inducible inflammatory genes by interferon-gamma is associated with altered nuclear factor-kappaB transactivation and enhanced histone deacetylase activity. *Molecular pharmacology* 71, 609–618. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17108260>.
- Knehr, M., Poppe, M., Enulescu, M., Eickelbaum, W., Stoehr, M., Schroeter, D., and Paweletz, N. (1995). A critical appraisal of synchronization methods applied to achieve maximal enrichment of HeLa cells in specific cell cycle phases. *Experimental cell research* 217, 546–553. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7698256>.
- Komeili, a, and O’Shea, E. K. (2000). Nuclear transport and transcription. *Current opinion in cell biology* 12, 355–360. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20946882>.
- Koutroubas, G., Merika, M., and Thanos, D. (2008). Bypassing the requirements for epigenetic modifications in gene transcription by increasing enhancer strength. *Molecular and cellular biology* 28, 926–938. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2223377&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 27, 2010].
- De Kretser, D. M., O’Hehir, R. E., Hardy, C. L., and Hedger, M. P. (2012). The roles of activin A and its binding protein, follistatin, in inflammation and tissue repair. *Molecular and cellular endocrinology* 359, 101–106. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22037168> [Accessed October 8, 2012].
- Kreutz, M., Krause, S. W., Hennemann, B., Rehm, a, and Andreessen, R. (1992). Macrophage heterogeneity and differentiation: defined serum-free culture conditions induce different types of macrophages in vitro. *Research in immunology* 143, 107–115. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1565839>.
- Laemmli, K. U. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature Publishing Group*.
- Larosa, D. F., and Orange, J. S. (2008). 1. Lymphocytes. *The Journal of allergy and clinical immunology* 121, S364–9; quiz S412. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18241683> [Accessed August 11, 2011].
- Lavigne, A., Mengus, G., May, M., Dubrovskaya, V., Tora, L., Chambon, P., and Davidson, I. (1996). Multiple Interactions between hTAF II 55 and Other TFIID Subunits. *The Journal of biological chemistry* 271, 19774–19780.

- LeBien, T. W., and Tedder, T. F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570–1580. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18725575> [Accessed June 28, 2011].
- Lee, J. Y., and Sullivan, K. E. (2001). Gamma Interferon and Lipopolysaccharide Interact at the Level of Transcription To Induce Tumor Necrosis Factor Alpha Expression. *Society* 69, 2847–2852.
- Li, V. C., Davis, J. C., Lenkov, K., Bolival, B., Fuller, M. T., and Petrov, D. a (2009). Molecular evolution of the testis TAFs of Drosophila. *Molecular biology and evolution* 26, 1103–1116. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2727373&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Liang, J., Jiang, D., Griffith, J., Yu, S., Fan, J., Zhao, X., Bucala, R., and Noble, P. W. (2012). Engagement of CD44 by hyaluronan suppresses TLR4 signaling and the septic response to LPS. *The Journal of Immunology* 178, 2469–2475.
- Liu, H., Shi, B., Huang, C., Eksarko, P., and Pope, R. M. (2008a). Transcriptional diversity during monocyte to macrophage differentiation. *Immunology letters* 117, 70–80.
- Liu, H., Sidiropoulos, P., Song, G., Pagliari, L. J., Birrer, M. J., Stein, B., Anrather, J., and Pope, R. M. (2000). TNF-alpha gene expression in macrophages: regulation by NF-kappa B is independent of c-Jun or C/EBP beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 164, 4277–4285. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10754326>.
- Liu, W., Coleman, R. A., Grob, P., King, D. S., Florens, L., Washburn, M. P., Geles, K. G., Yang, J. L., Ramey, V., Nogales, E., et al. (2008b). Structural changes in TAF4b-TFIID correlate with promoter selectivity. *Molecular cell* 29, 81–91. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2486835&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 12, 2011].
- Lovren, F., Pan, Y., Quan, A., Szmitko, P. E., Singh, K. K., Shukla, P. C., Gupta, M., Chan, L., Al-Omran, M., Teoh, H., et al. (2010). Adiponectin primes human monocytes into alternative anti-inflammatory M2 macrophages. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* 299, H656–63. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2944489&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 15, 2012].
- MacKenzie, S., Ferna, N., Espel, E., and Fernández-Troy, N. (2002). Post-transcriptional regulation of TNF-alpha during in vitro differentiation of human monocytes/macrophages in primary culture. *Journal of leukocyte biology* 71, 1026–1032. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12050189>.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology* 25, 677–686. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839> [Accessed March 1, 2012].
- Mao, H., Polliackq, A., B, V., Bfziv, S., Bimn, S., and Monocyte, K. W. (1986). Parameters Affecting the In Vitro Maturation of Human Monocytes to Macrophages. *International Journal Of Cell Cloning* 185, 167–185.

- Marafioti, T., Ascani, S., Pulford, K., Sabattini, E., Piccioli, M., Jones, M., Zinzani, P. L., Delsol, G., Mason, D. Y., and Pileri, S. a (2003). Expression of B-lymphocyte-associated transcription factors in human T-cell neoplasms. *The American journal of pathology* 162, 861–871. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1868085&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 22, 2012].
- Martinez, F. O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annual review of immunology* 27, 451–483. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19105661> [Accessed March 9, 2012].
- Matza, D., Kerem, A., Medvedovsky, H., Lantner, F., and Shachar, I. (2002). Invariant chain-induced B cell differentiation requires intramembrane proteolytic release of the cytosolic domain. *Immunity* 17, 549–560. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433362>.
- Matza, D., Wolstein, O., Dikstein, R., and Shachar, I. (2001). Invariant chain induces B cell maturation by activating a TAF(II)105-NF-kappaB-dependent transcription program. *The Journal of biological chemistry* 276, 27203–27206. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11371575> [Accessed August 27, 2010].
- Mengus, G., Fadloun, A., Kobi, D., Thibault, C., Perletti, L., Michel, I., and Davidson, I. (2005). TAF4 inactivation in embryonic fibroblasts activates TGF beta signalling and autocrine growth. *The EMBO journal* 24, 2753–2767. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1182243&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 22, 2010].
- Morey, L., and Helin, K. (2010). Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends in biochemical sciences* 35, 323–332. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20346678>.
- Naito, M., Hasegawa, G., and Takahashi, K. (1997). Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microscopy research and technique* 39, 350–364. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9407545>.
- Nakamura, A., and Seydoux, G. (2008). Less is more: specification of the germline by transcriptional repression. *Development (Cambridge, England)* 135, 3817–3827. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18997110> [Accessed August 3, 2012].
- Newman, S. L., Musson, R. a, and Henson, P. M. (1980). Development of functional complement receptors during in vitro maturation of human monocytes into macrophages. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 125, 2236–2244. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7430626>.
- Noursadeghi, M., Tsang, J., Haustein, T., Miller, R. F., Chain, B. M., and Katz, D. R. (2008). Quantitative imaging assay for NF-kappaB nuclear translocation in primary human macrophages. *Journal of immunological methods* 329, 194–200. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2225449&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed July 16, 2012].
- Ongeri, E. M., Verderame, M. F., and Hammond, J. H. (2007). The TATA binding protein associated factor 4b (TAF4b) mediates FSH stimulation of the IGFBP-3 promoter in cultured porcine ovarian granulosa cells. *Molecular and cellular endocrinology* 278 (1-2), 29–35.



- O'Dea, E., and Hoffmann, A. (2010). The regulatory logic of the NF-kappaB signaling system. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000216. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2827908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed June 28, 2010].
- Panne, D. (2008). The enhanceosome. *Current opinion in structural biology* 18, 236–242. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18206362> [Accessed October 18, 2012].
- Park, S. H., Park-Min, K.-H., Chen, J., Hu, X., and Ivashkiv, L. B. (2011). Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nature immunology* 12, 607–615. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3258532&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 12, 2012].
- Parker, L. C., Prince, L. R., and Sabroe, I. (2007). Translational Mini-Review Series on Toll-like Receptors : Networks regulated by Toll-like receptors mediate innate and adaptive immunity. *Clinical and Experimental Immunology* 147, 199–207.
- Pasini, D., Bracken, A. P., Jensen, M. R., Lazzerini Denchi, E., and Helin, K. (2004). Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *The EMBO journal* 23, 4061–4071. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15385962>.
- Paulnock, D. M. ed. (2006). *Macrophages* (Oxford University Press 2000).
- Paulson, M., Press, C., Smith, E., Tanese, N., and Levy, D. E. (2002). IFN-Stimulated transcription through a TBP-free acetyltransferase complex escapes viral shutoff. *Nature cell biology* 4, 140–147. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11802163> [Accessed October 18, 2012].
- Peralta, A. L., Malinarich, F., and Hermoso, M. A. (2007). Toll-like Receptors are Key Participants in Innate Immune Responses. *Biological Research* 40, 97–112.
- Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 14, 185–191. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359610103000224> [Accessed April 25, 2012].
- Phatnani, H. P., and Greenleaf, A. L. (2006). Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & development* 20, 2922–2936. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079683>.
- Pijnappel, W. P., Kolkman, A., Baltissen, M. P., Heck, A., and Timmers, H. M. (2009). Quantitative mass spectrometry of TATA binding protein-containing complexes and subunit phosphorylations during the cell cycle. *Proteome science* 7, 46. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2804597&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 11, 2012].
- Pugh, B. F., and Tjian, R. (1991). Transcription from a TATA-less promoter requires a multisubunit TFIID complex. *Genes & Development* 5, 1935–1945. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.5.11.1935> [Accessed October 26, 2012].
- Rashevsky-Finkel, a, Silkov, a, and Dikstein, R. (2001). A composite nuclear export signal in the TBP-associated factor TAFII105. *The Journal of biological chemistry* 276, 44963–44969. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567023> [Accessed August 27, 2010].

- Rasmussen, S. B., Reinert, L. S., and Paludan, S. R. (2009). Innate recognition of intracellular pathogens: detection and activation of the first line of defense. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* 117, 323–337. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19400860>.
- Rennert, P. D., James, D., Mackay, F., Browning, J. L., and Hochman, P. S. (1998). Lymph node genesis is induced by signaling through the lymphotoxin beta receptor. *Immunity* 9, 71–79. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9697837>.
- Rodero, M. P., and Khosrotehrani, K. (2010). Skin wound healing modulation by macrophages. *International journal of clinical and experimental pathology* 3, 643–653. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2933384&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Saurin, A. J., Shao, Z., Erdjument-bromage, H., Tempst, P., and Kingston, R. E. (2001). A Drosophila Polycomb group complex includes Zeste and dTAFII proteins. *Nature* 412, 655–660.
- Schneider, R., and Grosschedl, R. (2007). Dynamics and interplay of nuclear architecture , genome organization , and gene expression. *Genes & Development* 21, 3027–3043.
- Schroder, K., Hertzog, P. J., Ravasi, T., and Hume, D. A. (2004). Interferon-  $\gamma$  : an overview of signals , mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 75, 163–189.
- Schütt, C., and Bröker, B. (2009). *Grundwissen Immunologie* 2nd ed. (Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg 2009).
- Segil, N., Guermah, M., Hoffmann, a, Roeder, R. G., and Heintz, N. (1996). Mitotic regulation of TFIID: inhibition of activator-dependent transcription and changes in subcellular localization. *Genes & Development* 10, 2389–2400. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.10.19.2389> [Accessed August 12, 2011].
- Sen, R., and Smale, S. T. (2010). Selectivity of the NF- $\kappa$ B response. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2, a000257. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2845200&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Shao, H., Revach, M., Moshonov, S., Gazit, K., Albeck, S., Unger, T., Tzuman, Y., and Dikstein, R. (2005). Core Promoter Binding by Histone-Like TAF Complexes. *Molecular and cellular biology* 25, 206–219.
- Shaw, L. M., Messier, J. M., and Mercurio, a M. (1990). The Activation Dependent Adhesion of Macrophages to Laminin Involves Cytoskeletal Anchoring and Phosphorylation of the  $\alpha$ L6/31 Integrin. *The Journal of cell biology* 110, 2167–2174. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2116124&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Sherry, B., and Cerami, A. (1988). Cachectin/tumor necrosis factor exerts endocrine, paracrine, and autocrine control of inflammatory responses. *The Journal of cell biology* 107, 1269–1277. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2115248&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

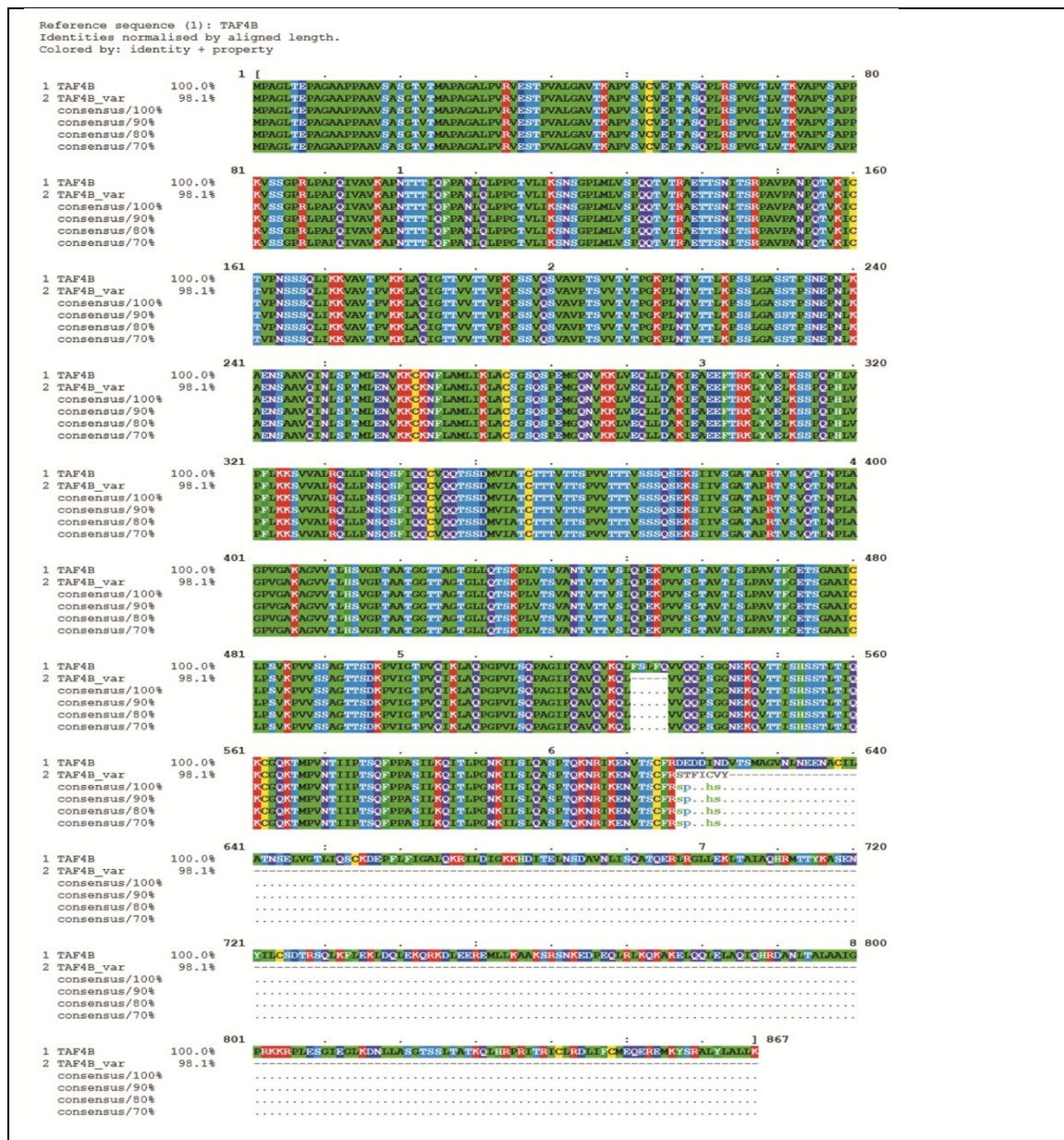
- Shi, C., and Simon, D. I. (2006). Integrin signals, transcription factors, and monocyte differentiation. *Trends in cardiovascular medicine* 16, 146–152. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781947>.
- Sica, A., Larghi, P., Mancino, A., Rubino, L., Porta, C., Totaro, M. G., Rimoldi, M., Biswas, S. K., Allavena, P., and Mantovani, A. (2008). Macrophage polarization in tumour progression. *Seminars in cancer biology* 18, 349–355. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18467122> [Accessed August 23, 2010].
- Silkov, A., Wolstein, O., Shachar, I., and Dikstein, R. (2002). Enhanced apoptosis of B and T lymphocytes in TAFII105 dominant-negative transgenic mice is linked to nuclear factor-kappa B. *The Journal of biological chemistry* 277, 17821–17829. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11856754> [Accessed August 27, 2010].
- Soutoglou, E., Demény, M. A., Scheer, E., Sassone-corsi, P., Tora, L., and Fienga, G. (2005). The Nuclear Import of TAF10 Is Regulated by One of Its Three Histone Fold Domain-Containing Interaction Partners. *Molecular and cellular biology* 25, 4092–4104.
- Su, I., Dobenecker, M.-W., Dickinson, E., Oser, M., Basavaraj, A., Marqueron, R., Viale, A., Reinberg, D., Wülfing, C., and Tarakhovsky, A. (2005). Polycomb group protein ezh2 controls actin polymerization and cell signaling. *Cell* 121, 425–436. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15882624> [Accessed July 15, 2012].
- Suk, K., and Erickson, K. L. (1996). Differential regulation of tumour necrosis factor- $\alpha$  mRNA degradation in macrophages by interleukin-4 and interferon- $\gamma$ .pdf. *Immunology* 87, 551–558.
- Surh, C. D., and Sprent, J. (1994). T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature* 372, 100–103. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7969401>.
- Sweet, M. J., and Hume, D. a (1996). Endotoxin signal transduction in macrophages. *Journal of leukocyte biology* 60, 8–26. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8699127>.
- Taira, N., Mimoto, R., Kurata, M., Yamaguchi, T., Kitagawa, M., Miki, Y., and Yoshida, K. (2012). DYRK2 priming phosphorylation of c-Jun and c-Myc modulates cell cycle progression in human cancer cells. *The Journal of clinical investigation* 122, 859–872.
- Takita, M., Furuya, T., Sugita, T., Kawauchi, S., Oga, A., Hirano, T., Tsunoda, S., and Sasaki, K. (2003). An analysis of changes in the expression of cyclins A and B1 by the cell array system during the cell cycle: comparison between cell synchronization methods. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology* 55, 24–29. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12938185> [Accessed August 27, 2010].
- Thomas, M. C., and Chiang, C.-M. (2006). The general transcription machinery and general cofactors. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 41, 105–178. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16858867>.
- Tora, L. (2002). A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)-associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes & Development* 16, 673–675. Available at: <http://www.genesdev.org/cgi/doi/10.1101/gad.976402> [Accessed May 19, 2011].
- Tuomisto, T. T., Riekkinen, M. S., Viita, H., Levonen, A.-L., and Ylä-Herttua, S. (2005). Analysis of gene and protein expression during monocyte-macrophage differentiation and cholesterol

- loading--cDNA and protein array study. *Atherosclerosis* 180, 283–291. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910854> [Accessed August 30, 2012].
- Uematsu, S., and Akira, S. (2006). Toll-like receptors and innate immunity. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 84, 712–725. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924467> [Accessed November 30, 2012].
- Valledor, a F., Borràs, F. E., Cullell-Young, M., and Celada, a (1998). Transcription factors that regulate monocyte/macrophage differentiation. *Journal of leukocyte biology* 63, 405–417. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544570>.
- Valledor, a F., Borràs, F. E., Cullell-Young, M., Celada, a, Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional Profiling of the Human Monocyte-to-Macrophage Differentiation and Polarization: New Molecules and Patterns of Gene Expression. *The Journal of Immunology* 177, 7303–7311. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9544570>.
- Vassallo, M. F., and Tanese, N. (2002). Isoform-specific interaction of HP1 with human TAFII130. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 5919–5924. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=122877&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Vereecke, L., Beyaert, R., and Van Loo, G. (2009). The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends in immunology* 30, 383–391. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19643665> [Accessed November 8, 2012].
- Verreck, F. a W., De Boer, T., Langenberg, D. M. L., Van der Zanden, L., and Ottenhoff, T. H. M. (2006). Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *Journal of leukocyte biology* 79, 285–293. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330536>.
- Verrijzer, C. P., and Tjian, R. (1996). TAFs mediate transcriptional activation and promoter selectivity. *Trends in biochemical sciences* 21, 338–342. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8870497>.
- Verstrepen, L., Verhelst, K., Van Loo, G., Carpentier, I., Ley, S. C., and Beyaert, R. (2010). Expression, biological activities and mechanisms of action of A20 (TNFAIP3). *Biochemical pharmacology* 80, 2009–2020. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20599425> [Accessed March 8, 2012].
- Voronina, E., Lovasco, L. a, Gyuris, A., Baumgartner, R. a, Parlow, A. F., and Freiman, R. N. (2007). Ovarian granulosa cell survival and proliferation requires the gonad-selective TFIID subunit TAF4b. *Developmental biology* 303, 715–726. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1950739&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed August 27, 2010].
- Wang, R., and Brattain, M. G. (2007). The maximal size of protein to diffuse through the nuclear pore is larger than 60kDa. *FEBS letters* 581, 3164–3170. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17588566> [Accessed July 30, 2012].
- Werner, S. L., Kearns, J. D., Zadorozhnaya, V., Lynch, C., O’Dea, E., Boldin, M. P., Ma, A., Baltimore, D., and Hoffmann, A. (2012). Encoding NF-kB temporal control in response to TNF

- distinct roles for the negative regulators I $\kappa$ B $\alpha$  and A20.pdf. *Genes & development* 22, 2093–2101.
- Westra, J., Doornbos-van der Meer, B., De Boer, P., Van Leeuwen, M. a, Van Rijswijk, M. H., and Limburg, P. C. (2004). Strong inhibition of TNF- $\alpha$  production and inhibition of IL-8 and COX-2 mRNA expression in monocyte-derived macrophages by RWJ 67657, a p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitor. *Arthritis research & therapy* 6, R384–92. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=464924&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed March 12, 2012].
- Witte, V., Laffert, B., Rosorius, O., Lischka, P., Blume, K., Galler, G., Stilper, A., Willbold, D., Aloj, P. D., Sixt, M., et al. (2004). HIV-1 Nef Mimics an Integrin Receptor Signal that Recruits the Polycomb Group Protein Eed to the Plasma Membrane Nikolaus-Fiebiger-Center for Molecular Medicine Institute for Experimental Pathology. *Molecular Cell* 13, 179–190.
- Wollenberg, G. K., DeForge, L. E., Bolgos, G., and Remick, D. G. (1993). Differential expression of tumor necrosis factor and interleukin-6 by peritoneal macrophages in vivo and in culture. *The American journal of pathology* 143, 1121–1130. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887059&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Wolstein, O., Silkov, A., Revach, M., and Dikstein, R. (2000). Specific Interaction of TAF II 105 with OCA-B Is Involved in Activation of Octamer-dependent Transcription \*. *Biochemistry* 275, 16459–16465.
- Woodward, E. a, Prêle, C. M., Nicholson, S. E., Kolesnik, T. B., and Hart, P. H. (2010). The anti-inflammatory effects of interleukin-4 are not mediated by suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS1). *Immunology* 131, 118–127. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2966764&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed October 20, 2011].
- Wu, Y., Lu, Y., Hu, Y., and Li, R. (2005). Cyclic AMP-dependent modification of gonad-selective TAF(II)105 in a human ovarian granulosa cell line. *Journal of cellular biochemistry* 96, 751–759. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16088961> [Accessed August 30, 2010].
- Wynes, M. W., and Riches, D. W. H. (2003). Induction of macrophage insulin-like growth factor-I expression by the Th2 cytokines IL-4 and IL-13. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 171, 3550–3559. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14500651>.
- Yamit-hezi, A., and Dikstein, R. (1998). TAFII105 mediates activation of anti-apoptotic genes by NF- $\kappa$ B. *The EMBO journal* 17, 5161–5169. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1170844&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Yamit-hezi, A., Nir, S., Wolstein, O., and Dikstein, R. (2000). Interaction of TAF II 105 with Selected p65 / RelA Dimers Is Associated with Activation of Subset of NF $\kappa$ B Genes. *The Journal of biological chemistry* 275, 18180–18187.
- Yang, X.-J. (2004). Lysine acetylation and the bromodomain: a new partnership for signaling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 26, 1076–1087. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15382140> [Accessed August 11, 2010].

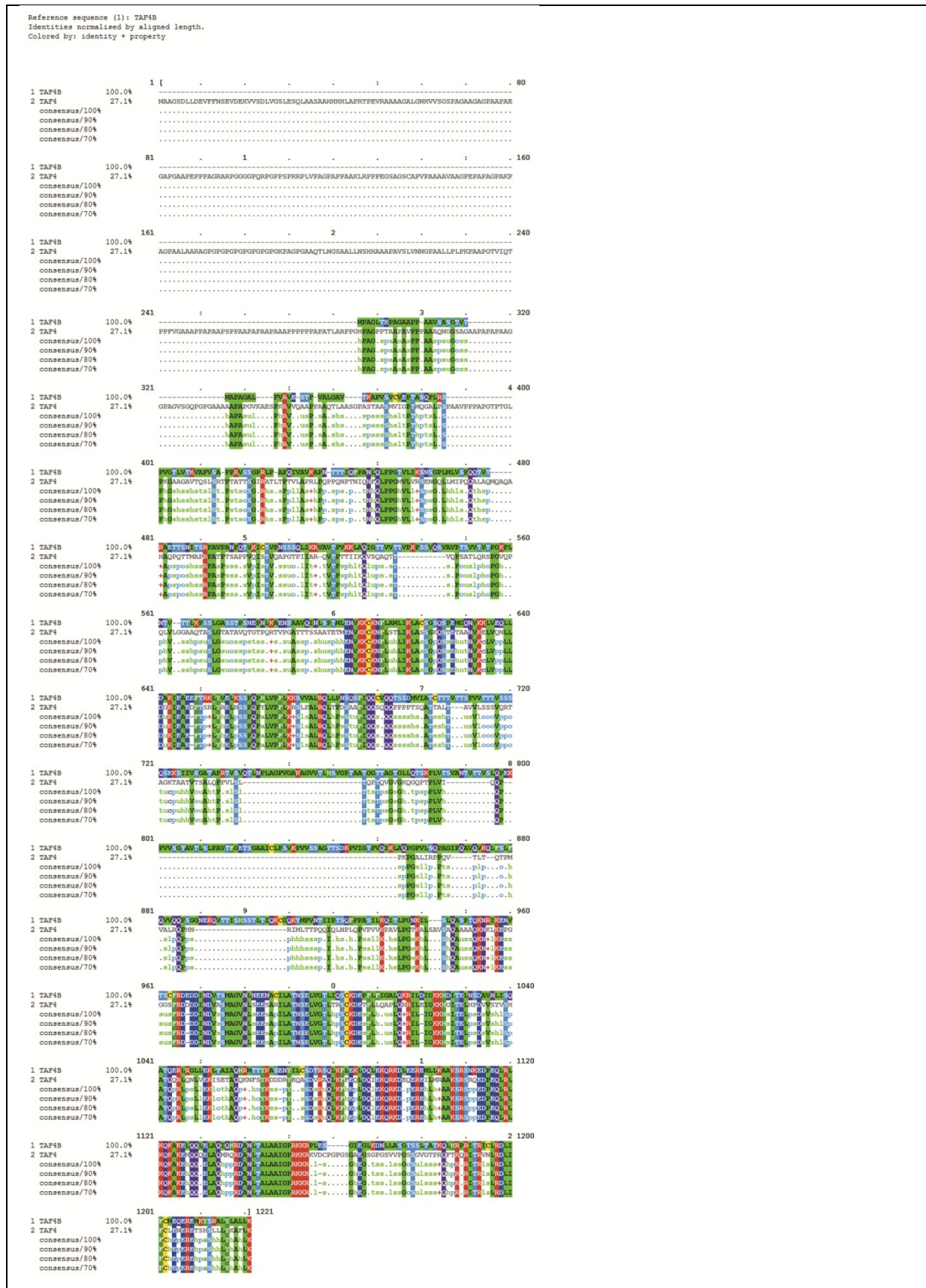
- Yasaka, T., Mantich, M. N., Boxer, A. L., and Baehner, L. R. (1981). FUNCTIONS OF HUMAN MONOCYTE AND LYMPHOCYTE SUBSETS OBTAINED BY COUNTERCURRENT CENTRIFUGAL ELUTRIATION : DIFFERING FUNCTIONAL CAPACITIES OF HUMAN MONOCYTE SUBSETS '. *Cell*, 2–5.
- Zolti, M., Meirom, R., Shemesh, M., Wollach, D., Mashiach, S., Shore, L., and Ben Rafael, Z. (1990). Granulosa cells as a source and target organ for tumor necrosis factor- $\alpha$ . *FEBS Letters* 261, 253–255. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/001457939080565Z>.

## 9. Anhang



**Abbildung 21. Alignment der Proteinsequenzen** von humanen TAF4B (HGNC Symbol;Acc:11538; Ensemble-Protein ID ENSP00000462980.1) und der humanen TAF4B-Splicevariante (TAF4B\_var; Ensemble-Protein ID ENSP00000383314.2). Die Protein-Sequenzen sind der ENSEMBL-Datenbank entnommen (<http://www.ensembl.org/>). Der Sequenz-Vergleich wurde mit Clustal Omega erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) und dargestellt durch MView (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/>).

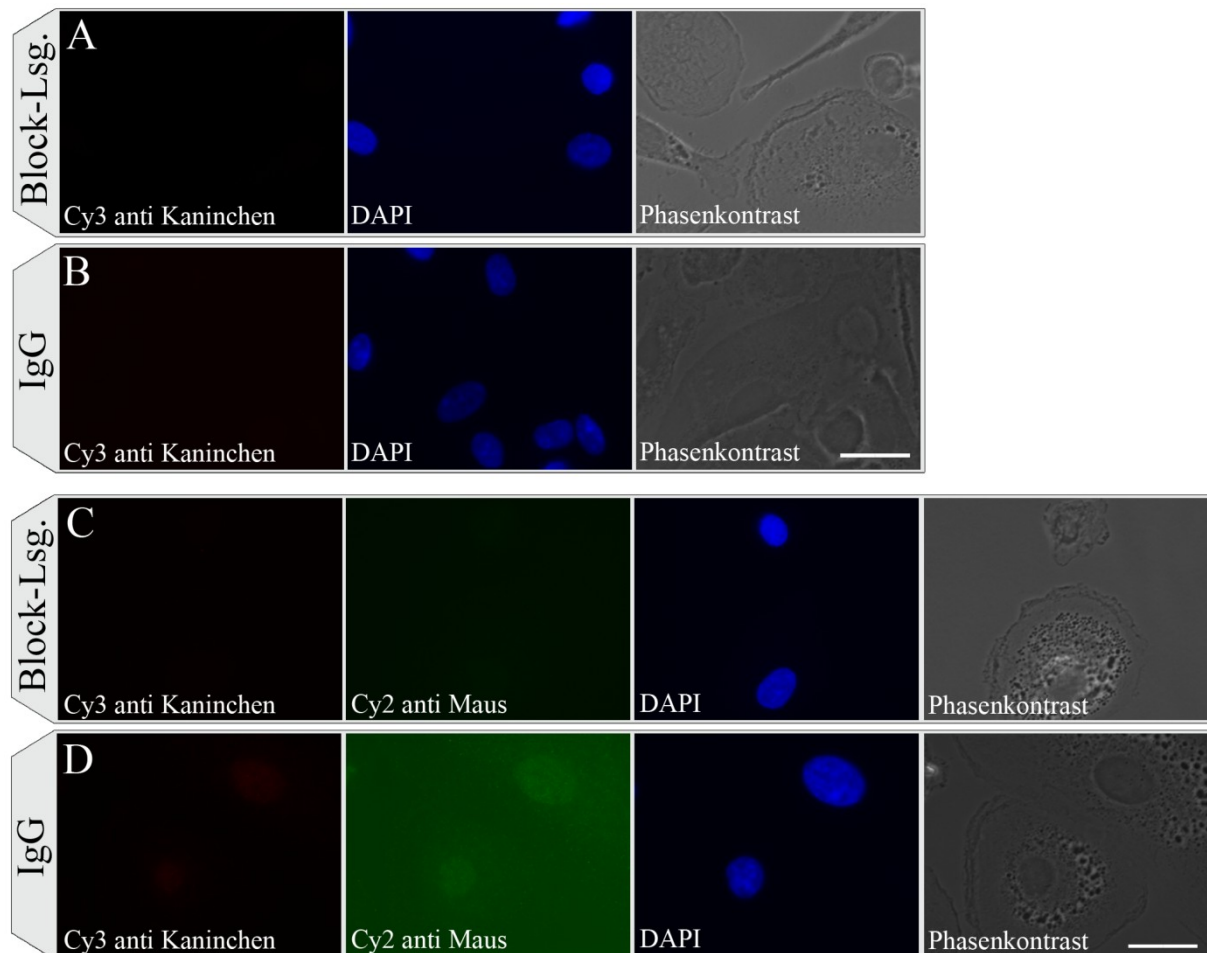




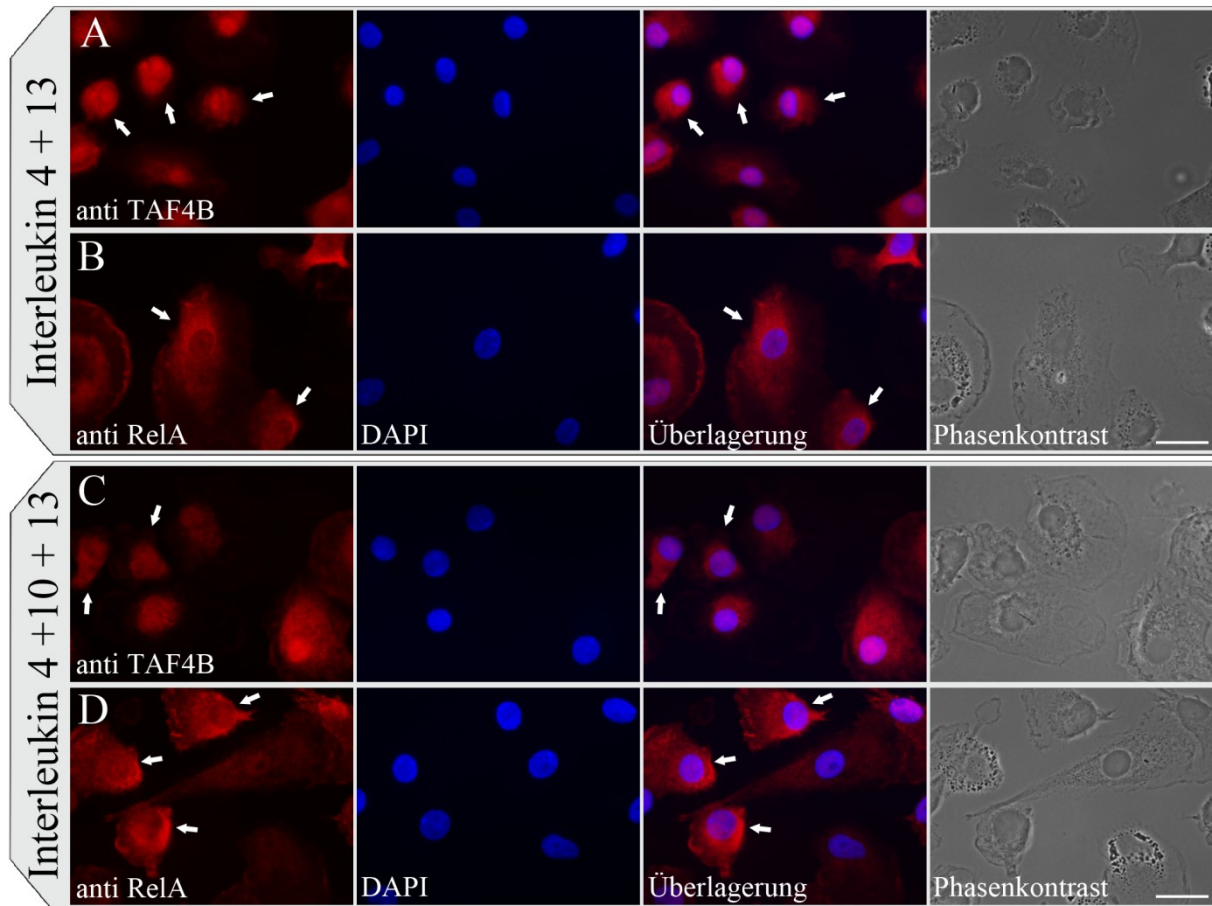
**Abbildung 22. Alignment der Proteinsequenzen** von humanen TAF4B (HGNC Symbol;Acc:11538; Ensemble-Transcript ID ENST00000400466) und TAF4 (HGNC Symbol;Acc:11537; Ensemble-Protein ID ENSP00000252996.3). Die Protein-Sequenzen sind der ENSEMBL-Datenbank entnommen



(<http://www.ensembl.org/>). Der Sequenz-Vergleich wurde mit Clustal Omega erstellt (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) und dargestellt durch MView (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mview/>).



**Abbildung 23. Negativ-Kontrollen des Immunofluoreszenz-Protokolls.** Das Immunofluoreszenz-Protokoll wurde ohne spezifischen, primären Antikörper durchgeführt. An Stelle des primären Antikörpers wurde Blocklösung (Block-Lsg.) oder unspezifische Kaninchen IgGs verwendet. In Reihe A und B sind Immunofluoreszenz-Färbungen gezeigt in welchen lediglich der gegen Kaninchen-IgG gerichtete, Cy3-gekoppelte Sekundär-Antikörper verwendet wurde. Zusätzlich sind die DAPI-Färbungen und Phasenkontrast-Aufnahmen der Zellen dargestellt. Reihen C und D, Immunofluoreszenz-Färbungen, in welchen die Cy3-gekoppelten, gegen Kaninchen-IgG gerichtete und zusammen mit Cy2-gekoppelten, gegen Maus-IgG gerichtete Sekundär-Antikörper verwendet wurden, wie sie auch in Ko-Immunofluoreszenz-Färbungen eingesetzt wurden. Maßstabsbalken = 20 µm. Unabhängig von der Stimulation der Zellen oder Differenzierung zeigte sich lediglich eine geringe Hintergrund-Färbung in Kaninchen-IgG-Kontrollen.



**Abbildung 24. Immunofluoreszenz gegen TAF4B und RelA in zehn Tage alten Makrophagen welche mit Interleukin 4, 10 und 13, für 72 Stunden stimuliert wurden.** Die Zellen wurden mit IL-4 und IL-13 (Reihe A und B) oder mit IL-4, IL-10 und IL-13 (Reihe C und D) stimuliert. In den stimulierten Zellen wurden Immundetektionen gegen TAF4B (anti TAF4B) oder RelA (anti RelA) durchgeführt. Die Zellen wurden zudem mit DAPI behandelt. Gezeigt sind zudem die Überlagerung der spezifischen Immunofluoreszenz und der jeweiligen DAPI-Färbung sowie Phasenkontrast-Aufnahmen. Sowohl TAF4B als auch RelA zeigen eine spezifische Lokalisation (Pfeile) in den Interleukin-behandelten Zellen. Maßstabsbalken = 20 µm.

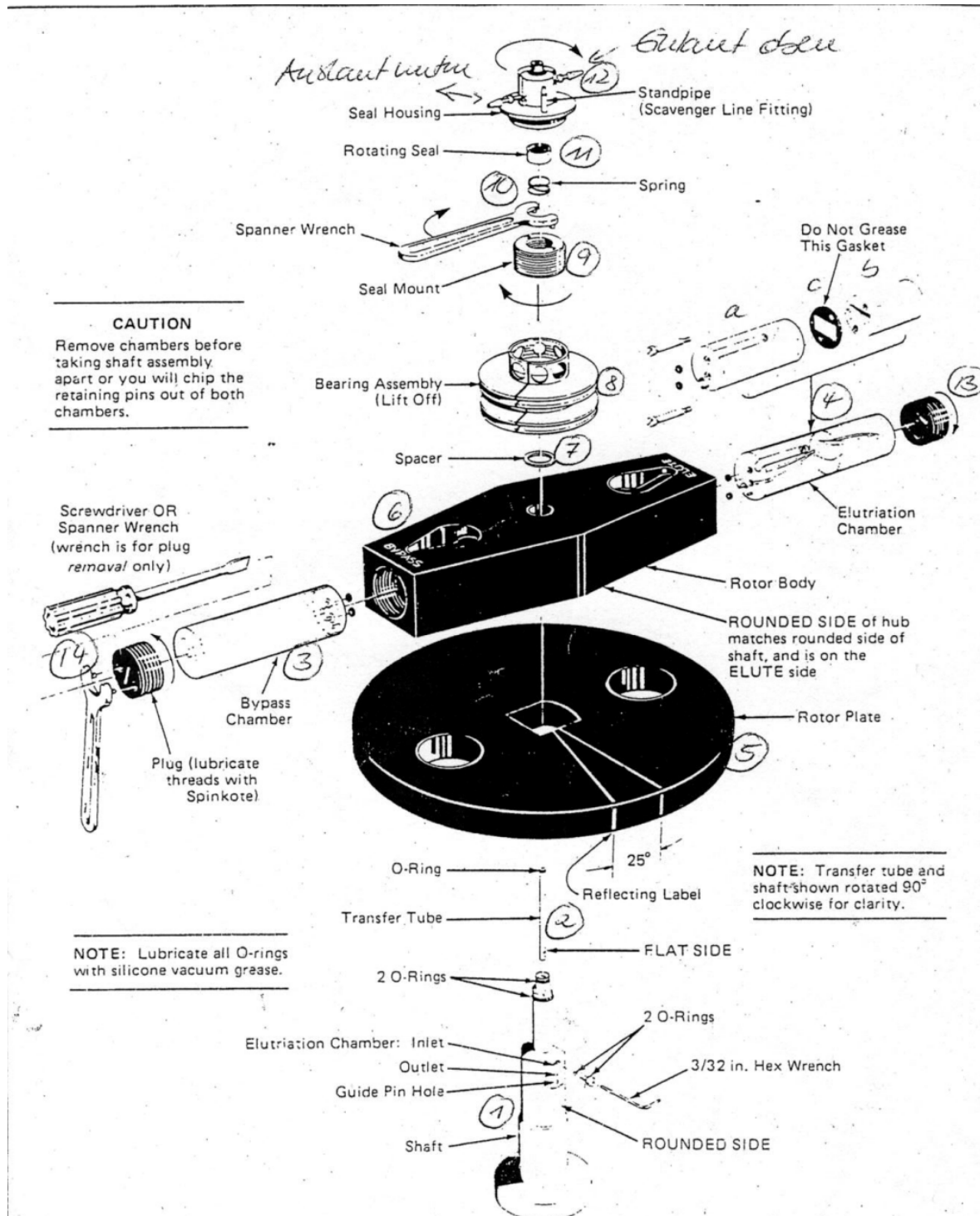


Abbildung 25. Schema des Aufbaus des Rotorsystems des Elutriators. Der Rotor war in der Zentrifuge J2-21 M/E der Beckmann Culture GmbH insalliert.

## Danksagung

Ich möchte mich hier als allererstes bei meinen Eltern bedanken, die mir immer beratend über die Schulter guckten, mich aber meinen eigenen Weg gehen ließen und mich vorbehaltlos unterstützten. Ich möchte auch Lea Danke sagen die in den letzten Jahren bei mir war, ein Anker für mich war, mit mir trank und auf den Betten tanzte.

Auch möchte ich ein herzliches Dankeschön an meine Chefin, Frau Renate Renkawitz-Pohl geben für die Unterstützung während meiner Arbeit und für Lob und Tadel. Zudem ein großes Danke an Christina für so manchen Rat und Kritik. Natürlich auch ein herzliches Danke an die Girls aus der Spermogruppe, Katja, Sophie Ina für das Feierabendbierchen und die Unterstützung im Labor. Danke natürlich auch der restlichen AG Renkawitz-Pohl vor allem Anja, Christina und Jessi.

Zudem ein Dankeschön an viele Leute aus weiteren Arbeitsgruppen, ganz vorne Benjamin Künemuth (AG Michl) und Andreas Kaufman (AG Bauer).

Und danke, danke an alle Freunde die es ausgehalten haben wenn ich mich mal nicht zurück gemeldet habe, am Wochenende keine Zeit hatte, einen Urlaub verplante, ich das ein oder andere Paper benötigte oder wenn ich mich aussprechen musste (Susi, Erik, Simon, Stefan, Daniel, Flo, Markus, Saskia, Maria, Andieh, Toddi, Roman, Maggus .....).

## LEBENS LAUF

Michael Schipper

Kontakt Daten: Adresse: Schwanallee 40, 35037 Marburg  
Festnetz: 06421/893988; Handy: 0176/21066420  
schippe3@staff.uni-marburg.de

Persönliche Daten: Geboren am 25.04.1982 in Mainz, ledig  
Deutsche Staatsangehörigkeit

Schulbildung: 1989-1993      Grundschule Kurt-Schumacher-Schule,  
   Windecken  
1993-1997      Gymnasium Steinmühle, Marburg  
1997-1999      Gymnasium der Otto-Hahn-Schule,  
   Hanau  
1999-2003      Gymnasium Steinmühle, Marburg  
   Abschluss: Abitur

Bundeswehr: ausgemustert

Studium: 2003-2009 Biologiestudium auf Diplom an der Philipps-Universität Marburg  
Hauptfächer Zoologie, Zellbiologie, Tierphysiologie  
Diplomarbeit durchgeführt in der Arbeitsgruppe Prof. Monika Hassel  
am Fachbereich Biologie, Philipps-Universität Marburg.  
Titel der Diplomarbeit: „Funktionsanalyse von Nanos in der  
Keimzellentwicklung von *Platynereis dumerilii*“

Promotion:

Begonnen am 1. April 2009 bis voraussichtlich Januar 2013.

Promotion im LOEWE-Graduierten Kolleg „Tumor und Entzündung“. Durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Professor Renate Renkawitz-Pohl am Fachbereich Biologie (Entwicklungsbiologie), Philipps- Universität Marburg mit Co-Betreuung durch Professor Stefan Bauer, Immunologie, BMFZ Marburg. Vorläufiger Titel: „TAF4B begleitet die Differenzierung von humanen Makrophagen und bindet nach inflammatorischer Stimulation zusammen mit NFkB an den Promoter von tumor necrosis factor alpha“

## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „**TAF4B begleitet die Differenzierung von humanen Makrophagen und bindet nach inflammatorischer Stimulation zusammen mit NFκB an den Promoter von *tumor necrosis factor alpha***„

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich angegebenen Quellen und Hilfen bedient habe. Die vorliegende Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 18. Januar 2012

---

**Anhang I zur Promotionsordnung:**  
(Zulassungsantrag zum Prüfungsverfahren)

Muster

Name, Anschrift

Ort, Datum

An den  
Vorsitzenden des Promotionsausschusses  
am Fachbereich \_\_\_\_\_

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Unter Überreichung meiner Dissertation:

bitte ich, mich zum Prüfungsverfahren zuzulassen.

Betreuer meiner Arbeit war \_\_\_\_\_

Als Mitglieder der Prüfungskommission schlage ich vor:

(Bei Disputation)

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

als Erstgutachter

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

als Zweitgutachter

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

(Bei Rigorosum)

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

als Erstgutachter und Prüfer im Hauptfach

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

als Zweitgutachter

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

als Prüfer im Nebenfach

Herrn/Frau Prof. Dr. \_\_\_\_\_

als Prüfer im Nebenfach

Meine Dissertation ist noch nicht / ist zum Teil / ist gedruckt erschienen (hierzu nähere Angaben).

Die Bestimmungen der Promotionsordnung, insbesondere über die Veröffentlichung der Dissertation sind mir bekannt.

Unterschrift

**Anlagen**



